

Aus dem Institut für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. D. B. Jones
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Untersuchungen zur Bedeutung der Phospholipase C bei
der Mechanotransduktion in Osteosarkomzellen mittels
induzierbarer Antisense-Suppression**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Hans-Henning Gratz aus Marburg
Marburg, 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am 8.11.2007.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. D. B. Jones

Korreferent: Prof. Dr. M. Schnabel

Meiner Familie

Inhalt

Marburg, 2007	1
1 EINLEITUNG	7
1.1 Aufbau und Funktion des Knochens	7
1.1.1 Aufbau des Knochens	7
1.1.2 Funktion des Knochens	8
1.1.3 Umbauvorgänge im Laufe des Lebens	9
1.1.4 Zusammenhang zwischen Knochensynthese und Knochenresorption	10
1.2 Mechanorezeption in Knochenzellen	11
1.2.1 Einleitung	11
1.2.2 Mechanorezeption in Osteozyten / Osteoblasten	12
1.2.3 Drei Transduktionsmodelle	13
1.2.3.1 Mechanosensitive Ionenkanäle	13
1.2.3.2 Strömungspotentiale	14
1.2.3.3 Mechanotransduktion unter Beteiligung des Zytoskelettes	14
1.2.4 Zelluläre Antwort auf mechanische Reizung	15
1.2.4.1 Unmittelbare Antworten	15
1.2.4.2 Frühe Antworten	16
1.2.4.3 Späte Antworten	16
1.3 Die phosphoinositol-spezifische Phospholipase C	17
1.3.1 Struktur der PLC	20
1.3.1.1 Die katalytische α/β Formation	20
1.3.1.2 X/Y- verbindende Sequenz (Z-Region)	21
1.3.1.3 Die PH-Domäne	21
1.3.1.4 Die EF-Hand-Motive	21
1.3.1.5 Die C2-Domäne	22
1.3.1.6 Das karboxyterminale Ende	22
1.3.2 Die Phospholipase C β -Isoenzyme	22
1.3.3 Kontrolle der PLC β durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	23
1.3.4 Die Rolle der Phospholipase C in der Mechanotransduktion	25
1.4 Dehnungsapplikation	27
1.4.1 Physiologische Knochenbelastung	27
1.5 Untersuchung mittels Antisense-RNA	29
1.6 Klinische Relevanz	31
1.7 Zielsetzung der Arbeit	32
2 MATERIAL UND METHODEN	34
2.1 Material	34

2.1.1 Lösungen und Puffer.....	34
2.1.2 Oligonukleotide.....	35
2.1.3 Bakterienstamm.....	35
2.1.4 Plasmide.....	35
2.1.5 Zelllinien.....	35
2.1.6 Nährmedien.....	35
2.1.7 Antikörper.....	36
2.1.8 Geräte.....	36
2.1.9 Sonstige Materialien.....	37
2.2 Zellkultur.....	38
2.2.1 Zellkultivierung.....	38
2.2.2 Passagieren.....	38
2.2.3 Kryokonservierung.....	39
2.3 Dehnungsexperimente.....	40
2.3.1 Die Vier-Punkt-Dehnungsmaschine.....	40
2.4 MTT-Zellproliferationsassay.....	43
2.5 Western-Transfer-Verfahren.....	44
2.5.1 Proteingewinnung.....	44
2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	45
2.5.3 Diskontinuierliche Proteinelektrophorese.....	46
2.5.4 Proteinauftrennung im Gel und Proteintransfer.....	47
2.5.5 Ponceau-S-Färbung.....	48
2.5.6 Immunologische Proteindetektion.....	49
2.6 Molekularbiologie.....	51
2.6.1 Transfektion und Selektion.....	51
2.7 Arbeiten mit Bakterienkulturen.....	52
2.7.1 Herstellung kompetenter Zellen.....	52
2.7.2 Transformation.....	53
2.7.3 Lagerung von E. coli.....	53
2.8 Genexpression mit Hilfe des Ecdyson-Systems.....	53
2.8.1 Ponasterone A.....	54
2.8.2 Aktivierung der Genexpression durch Ponasterone A.....	54
3 ERGEBNISSE.....	55
3.1 Dehnungsexperimente mit U-2/OS und MG-63 Wildtyp-Zellen.....	55
3.1.1 Proliferationsassay U-2/OS.....	55
3.1.2 Proliferationsassay MG-63.....	56
3.2 Western-Analyse der verschiedenen Zelllinien.....	57
3.2.1 Dosis-Wirkungs-Beziehung in MG-63 β 2 Antisense Zellen.....	57
3.2.2 Western Analyse der Antisense Zelllinien.....	61

3.2.2.1 Die PLC β 1 in U-2/OS- und in U-2/OS β 1 Antisense Zellen.....	61
3.2.2.2 Die PLC β 2 in U-2/OS- und in U-2/OS β 2 Antisense Zellen.....	63
3.2.2.3 Die PLC β 3 in U-2/OS und in U-2/OS β 3 Antisense Zellen.....	64
3.2.2.4 Die PLC β 1 in MG-63 und in MG-63 β 1 Antisense Zellen	66
3.2.2.5 Die PLC β 2 in MG-63 und in MG-63 β 2 Antisense Zellen.....	67
3.3 Dehnungsexperimente mit Antisense Zellen	70
3.3.1 Proliferationsassay MG-63 β 1-AS.....	71
3.3.2 Proliferationsassay MG-63 β 2-AS.....	72
4 DISKUSSION.....	74
4.1 Auswahl eines geeigneten Systems zur Zellkultur	76
4.2 Die Rolle der Phospholipase C in der Mechanotransduktion	80
4.3 Entwicklung eines induzierbaren Knockout-Systems	83
4.4 Alternative Methoden zur Enzymsuppression	87
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	89
6 LITERATUR.....	91
7 ANHANG.....	115

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion des Knochens

1.1.1 Aufbau des Knochens

Knochen besteht aus einer organischen Matrix welche durch Ablagerung von Kalziumsalzen in ihrer Struktur unterstützt wird. 95% seiner organischen Matrix werden von Kollagenfasern des Typs I gebildet. Die restlichen 5% machen Proteoglykane und verschiedene kollagenöse Proteine aus. Die in den Knochen eingelagerten kristallinen Salze, die unter zellulärer Kontrolle stehen, sind hauptsächlich Kalzium und Phosphate in der Form von Hydroxylapatit.

Desweiteren ist der Knochen aus vier verschiedenen Zelltypen zusammengesetzt. Man unterscheidet Vorläuferzellen, Osteoklasten, Osteoblasten und Osteozyten (siehe auch Abb. 1.1.1-1):

1. Vorläuferzellen sind während des gesamten Lebens auf der Knochenoberfläche vorhanden. Sie sind mesenchymaler Herkunft; zu ihnen gehören auch die oberflächenbekleidenden Zellen, die sogenannten „Lining cells“, welche dem Knochen direkt aufliegen und sich in Osteoblasten umwandeln können.
2. Osteoblasten sind ausdifferenzierte Zellen, die für die Produktion der organischen Knochenmatrix verantwortlich sind. Sie zeigen den für diese Art Zellen typischen Aufbau mit einem prominenten Golgi-Apparat und gut ausgebildetem rauen endoplasmatischem Retikulum. Osteoblasten sind polarisierte Zellen: die Abgabe der Syntheseprodukte erfolgt jeweils dort, wo die Zellen mit Knochengrundsubstanz in Berührung stehen.
3. Der Osteozyt ist ein reifer Osteoblast mitten in der Knochenmatrix, der für deren Aufrechterhaltung zuständig ist (Buckwalter et al. 1995a; Buckwalter et al. 1995b). Osteozyten kommunizieren mit benachbarten Zellen über „Gap junctions“. Sie können Knochengrundsubstanz sowohl synthetisieren als auch resorbieren.
4. Die mehrkernigen knochenresorbierenden Osteoklasten entwickeln sich aus der Fusion von mononukleären Vorläufern des hämatopoetischen

Systems, wohingegen die drei anderen genannten Zelltypen aus Osteoprogenitor-Zellen entstehen.

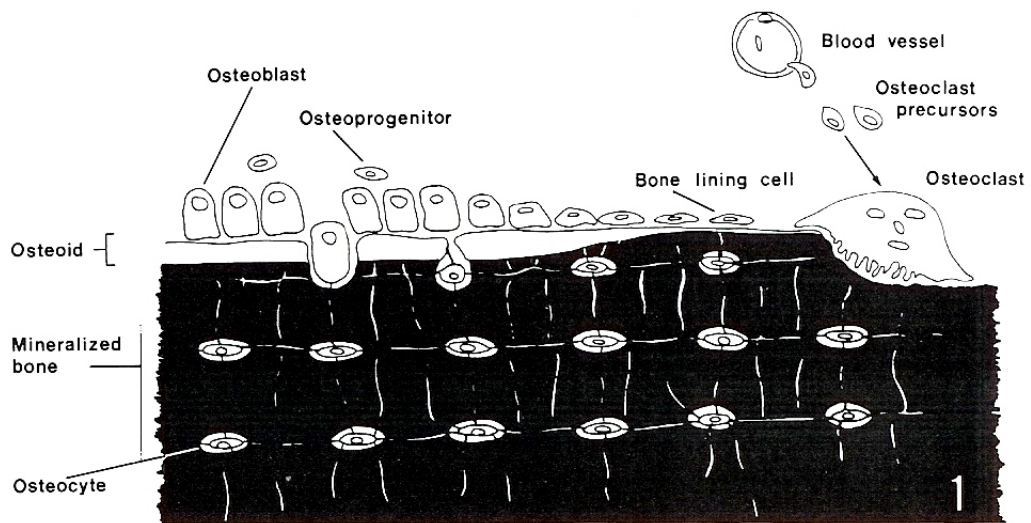


Abbildung 1.1.1-1: Die Herkunft und Lokalisierung der Zellen des Knochens
(aus *Bone Biology, The Structure and Development of Bone*)

Die Koordination der Aktivität der Knochenzellen ist nicht nur von humoralen Faktoren abhängig. Auch lokale Faktoren sind hier entscheidend und regulieren die Aktivität der Knochenzellen (siehe 1.1.3). Die Komplexität der Skelettentwicklung und Skelettaufrechterhaltung werden jetzt erst langsam verstanden.

1.1.2 Funktion des Knochens

Knochen ist ein lebendes, dynamisches Bindegewebe, das sich im Wesentlichen zur Erfüllung zweier Funktionen entwickelt hat:

1. Zur Bereitstellung einer mechanischen Einheit zur Bewegung und zum Schutz wichtiger Organe.
2. Zur Beteiligung an metabolischen Vorgängen, die mit der Homöostase des Mineralhaushalts zusammenhängen.

Seit Jahrhunderten wird versucht diese mechanischen und metabolischen Eigenschaften des Knochens zu charakterisieren. Hierdurch sollen Zusammenhänge zwischen fortschreitender Knochenalterung, metabolischen

Erkrankungen und hieraus resultierendem erhöhten Frakturrisiko hergestellt werden. Seit Galileos Beobachtungen zur Schwerkraft wurde angenommen, dass die innewohnende Knochenstruktur von mechanischer Kraft, die durch normale Funktion hervorgerufen wird, beeinflusst wird. Eine allgemeingültige Definition dieser Struktur-Funktionsbeziehung wurde während des späten 19. Jahrhunderts erstmalig durch Julius Wolff postuliert. Allgemein hin ist dies als Wolffs Gesetz bekannt, publiziert als „Das Gesetz der Transformation des Knochens“ (Wolff 1892). Die Prinzipien von Wolffs Gesetz beruhen auf dem Konzept, dass eine Beziehung zwischen dem Muster der trabekulären Ausrichtung der Knochenmatrix und der Richtung der Hauptkraft, die auf den Knochen bei normaler Beanspruchung einwirkt, besteht. Unter physiologischen Bedingungen ist die Struktur-Funktionsbeziehung mit der Mineralhomöostase gekoppelt: ein optimales Materialdesign-Konzept.

Wilhelm Roux war dann der erste, der die Notwendigkeit einer Dynamik des Knochenstoffwechsels im Sinne von Resorption zur Adaptation des Knochens an seine mechanische Umgebung postulierte (Dibbets 1992; Roux 1881).

1.1.3 Umbauvorgänge im Laufe des Lebens

Die Aktivität der Knochenzellen variiert während der Lebensspanne des menschlichen Organismus beträchtlich. Diese Variation ist notwendig, um während der ersten zwei Lebensdekaden die Skelettausreifung und das Wachstum voran zu treiben, was als Modellierung bezeichnet wird. Während dieser Phase überschreitet die Knochenneubildung die Knochenresorption.

Während der nächsten drei Dekaden wird das erwachsene Skelett durch Resorption und Erneuerung aufrecht erhalten. Hierbei befinden sich die Knochenresorption und -synthese im konstanten, kontrollierten Gleichgewicht (siehe 1.1.4). Der Umbau und die reizangepasste Adaptation dürfen hierbei jedoch nicht zu einer ständigen Zunahme der Knochenmasse führen. Dies wird durch einen ständigen Umbau der externen Geometrie und der internen Mikroarchitektur des Knochens erreicht. Dieser als „bone remodeling“, Knochenremodellierung, bezeichnete Prozess beginnt mit lokaler Resorption, welcher eine Knochenneubildung an der selben Stelle folgt (Parfitt 1994). Der Umbauprozess

wird durch eine Vielzahl biochemischer und mechanischer Faktoren gesteuert. Der Zweck des Umbaus liegt in der Adaptation des Knochens an seine mechanische und biodynamische Umgebung. Bei Belastung kommt es zu einer Zunahme der Knochendichte als Resultat einer Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen Knochendegradation und Knochenproduktion zugunsten der Produktion. Bei Entlastung des Knochens kommt es entsprechend zum Überwiegen der Resorption.

Nach der fünften Lebensdekade kann die Knochenneubildung nicht mehr mit der Resorption mithalten. Die Knochenmasse und das trabekuläre Netzwerk nehmen ab. Hierdurch steigt die Frakturneigung.

1.1.4 Zusammenhang zwischen Knochensynthese und Knochenresorption

In der histologischen Verlaufsbeobachtung zeigt sich im erwachsenen Skelett die Abfolge von Knochenresorption und anschließender Knochensynthese. Diese beiden Vorgänge durchlaufen simultane, gleichgerichtete Veränderungen. Aus diesen Erkenntnissen erwuchs die Hypothese der „Kopplungsfaktoren“. Diese haben sowohl Einfluss auf die Knochenresorption als auch auf die Knochensynthese. Unter ihnen sind Prostaglandin E, Parathormon, Interleukin 1, TGF- β und IGF zu finden (Baylink et al. 1993; Centrella et al. 1994; Dempster et al. 1993; Jee et al. 1995).

Frost und Rodan propagieren eine Kopplung von Knochenresorption und -synthese durch eine mechanische Belastung des Knochens (Rodan 1991; Rodan 1996; Frost 1987). Ihre „Mechanostat-Theorie“ differenziert zwischen Auf- und Umbauprozessen, die durch distinkte Schwellenwerte zur Aktivierung der Knochensynthese voneinander getrennt sind. Für eine ausgeglichene Knochenhomöostase geben Frost und Rodan unter physiologischen Bedingungen eine Belastung des Knochens von 1.500 $\mu\epsilon$ bis 2.500 $\mu\epsilon$ und für eine starke Belastung von bis zu 4.000 $\mu\epsilon$ bis 5.000 $\mu\epsilon$ an (1 Strain (ϵ) bedeutet eine Längenänderung um 100%). Als physiologische Größen werden Dehnungen im Bereich von $\mu\epsilon$ angenommen. Alle Werte über 5.000 $\mu\epsilon$ sind sicher unphysiologisch. Das Modell von Frost und Rodan ist jedoch sehr rigide und es fehlt die Berücksichtigung der Frequenz und Zahl der Belastungszyklen.

1.2 Mechanorezeption in Knochenzellen

1.2.1 Einleitung

Verstärkte mechanische Belastung von Knochengewebe führt zu gesteigerter Knochenneubildung und reduziertem Knochenabbau (Rubin & Lanyon 1984; Sessions et al. 1989). Hingegen führt längere Entlastung des Knochens, wie sie zum Beispiel in der Schwerelosigkeit vorkommt, zu einer geringeren Knochenmatrixproduktion (Patterson-Buckendahl et al. 1985), zu einem geringeren Mineralgehalt (Uthoff & Jaworski 1978) und einer erhöhten Knochenresorptionsrate (Cann & Adachi 1983; Uthoff et al. 1978). Außerdem resultiert ein schneller Verlust des Gesamtkalziums (Weinreb et al. 1991; Rambaut & Johnston 1979).

Bis heute bleibt jedoch weitgehend unklar, welche Art von Signalen die Knochenzellen tatsächlich wahrnehmen können. Die Belastung an sich kann von der Zelle nicht detektiert werden. Es stehen ihr jedoch Möglichkeiten zur Verfügung die hieraus resultierende Zelldeformation oder das entstehende Strömungspotential „wahrzunehmen“ und sie weiter umzusetzen (persönliche Mitteilung D. B. Jones, Labor für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik, Philipps-Universität Marburg). Drei Formen der Belastung sind definiert: Dehnung, Scherkräfte und Kompression. Diese unterschiedlichen Kräfte wirken auf die verschiedenen Knochenzellen bei Bewegung des Organismus ein. Nach Rubin ist die Knochenbiegung für 89% der auf die Knochenzellen einwirkenden Kräfte verantwortlich (Rubin & Lanyon 1985; El Haj & Thomas 1994).

Glücksman unternahm in den frühen vierziger Jahren die wahrscheinlich ersten Untersuchungen zur Auswirkung äußerer mechanischer Einflüsse auf die Knochendifferenzierung. Er führte diese Versuche an Gewebekulturen durch und konstatierte einen die Osteogenese stimulierenden Effekt der mechanischen Reizung (Glücksman 1942).

Einige Studien gaben Anlass zu der Vermutung, dass die applizierte Belastung zu verstärkter Zellproliferation führt, wohingegen andere eine Suppression der Proliferation und eine verstärkte Differenzierungsaktivität zeigten. Ein möglicher

Schluss hieraus ist, dass starke applizierte Kräfte die Zellproliferation aktivieren und niedrigere Belastungen zu Differenzierungsaktivitäten und zur Matrixproduktion führen (Burger & Veldhuijzen 1993). Eine mechanische Stimulation von in vitro kultivierten Osteoblasten führt zu einer erhöhten Proliferationsrate (Jones et al. 1988; Jones et al. 1991; Vandeburgh et al. 1989; Burger & Veldhuijzen 1993).

Frost zeigte, dass Osteoblasten und Osteozyten kleine Deformationen oder Dehnungen innerhalb des Knochens detektieren, die aus den von Außen applizierten Kräften resultieren (Frost 1983; Frost 1964). So konnte nachgewiesen werden, dass Osteoblasten auf diese Art der Belastung reagieren (Buckley et al. 1988; Harter et al. 1995; Murray & Rushton 1990; Somjen et al. 1980). Ein Teil dieser Experimente wurde allerdings mit Belastungen von mehr als 10000 $\mu\epsilon$ durchgeführt. Typische Belastungen des menschlichen Knochens bei energischen Bewegungen liegen jedoch im Bereich von 2000 $\mu\epsilon$ (Burr et al. 1996).

Ein Alternativmodell schlägt die Bewegung extrazellulärer Flüssigkeiten als Ursache für die Antwort von Knochenzellen auf mechanische Belastung vor (Reich et al. 1990; Weinbaum et al. 1994). Mechanische Belastung verstärkt den intramedullären Flüssigkeitsstrom indem Flüssigkeit durch die Knochenkortikalis gepumpt wird (Duncan & Turner 1995). Sowohl Osteoblasten als auch Osteozyten zeigen eine Antwort auf diese Flüssigkeitsbewegungen (Klein-Nulend et al. 1995a; Reich et al. 1990).

1.2.2 Mechanorezeption in Osteozyten / Osteoblasten

Es ist bislang unbekannt welche Zellen des Knochens die Sensoren des mechanischen Inputs sind, und welche diesen Input in mechanische Anpassung und biochemische Signale umsetzen.

Osteozyten sind untereinander und zu anderen Knochenzellen wie Osteoblasten durch zelluläre Ausläufer in den Kanalikuli der nicht mineralisierten Matrix verbunden. Diese Ausläufer sind durch „Gap Junctions“ verbunden, die für die interzelluläre Kommunikation notwendig sind (Klein-Nulend et al. 1995b). Hierdurch wird elektrische Kopplung und inter- bzw. extrazellulärer Transport von Signalmolekülen ermöglicht.

Genau wie Osteozyten zeigen auch Osteoblasten eine vermehrte Synthese von anabolen Faktoren wie Prostaglandin E₂ und cAMP bei Dehnung in physiologischen Größenordnungen von 500 bis 10000 $\mu\epsilon$ (Harell et al. 1977). Auch Burger und Veldhuijzen diskutieren diese zwei Zelltypen, die die Rezeption und biochemischen Umsetzung von externen Signalen erfüllen: Osteozyten und Zellen osteoblastären Ursprungs (Burger & Veldhuijzen 1993).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Osteoblasten, Osteozyten und „Bone lining cells“ ihre RNA-Produktion und die Glukoseutilisation als Antwort auf mechanischen Stress verstärken (Pead et al. 1988; Skerry et al. 1989).

Nur etwa 5% der Knochenoberfläche sind mit Osteoblasten bedeckt (Parfitt 1983). Deshalb argumentieren Aarden et al. sowie Duncan und Turner, dass bedingt durch diesen geringen Anteil eine funktionelle Anpassung des Knochens auf mechanische Reize durch Osteozyten erfolgen muss (Aarden et al. 1994; Duncan & Turner 1995). Diese Annahme ist jedoch lediglich durch die Häufigkeitsverteilung begründet, was allein kein Argument sein kann. Osteoblasten zeigen in vivo und in vitro eine ebensolche Sensitivität für externe mechanische Reize wie Osteozyten.

1.2.3 Drei Transduktionsmodelle

Der genaue Mechanismus, wie Zellen die von außen auf sie einwirkende Kräfte in biochemische Signale umsetzen, ist bislang kaum verstanden. Es existieren jedoch drei allgemein anerkannte Modelle, die sich in ihrer Funktionsweise ergänzen. Sie werden im Folgenden erklärt:

1.2.3.1 Mechanosensitive Ionenkanäle

Verschiedene Studien haben für unterschiedliche Gewebe wie Muskelzellen gezeigt, dass Kaliumkanäle durch mechanische Kräfte gesteuert werden können. Diese Kaliumkanäle sind mit dem Zytoskelett assoziiert (Kim et al. 1993; Guharay & Sachs 1984). Auch in humanen Osteoblasten konnten solche mechanosensitiven Kationenkanäle identifiziert werden, die mit dem Zytoskelett assoziiert sind (Duncan & Misler 1989; Davidson et al. 1990). Hier muss jedoch noch geklärt werden, ob die Öffnung des Kanals eine direkte Folge der

Deformation des Zytoskelettes darstellt, oder ob die Öffnung durch eine Aktivierung der Phospholipase C zustande kommt, worauf Untersuchungen in Osteoblasten von Jones und Bingmann hinweisen (Jones & Bingmann 1991).

1.2.3.2 Strömungspotentiale

Ein weiteres Modell für den Mechanotransduktionsmechanismus wurde von Basset und Becker publiziert. Sie postulieren, dass das Auftreten von Piezoelektrizität und Strömungspotentialen am physiologischen Regulationsmechanismus der Adaptation des Knochens an seine mechanische Beanspruchung beteiligt ist. Nach ihren Modellen führt die mechanische Deformation der Zelle zum Strom interstitieller Flüssigkeit. Die Folge hiervon sind Strömungspotentiale über der Zelloberfläche (Basset & Becker 1962). Ob diese Strömungspotentiale jedoch in vivo eine Rolle spielen, muss noch geklärt werden. Nach Jones Ergebnissen existiert offenbar nur eine schwache Kopplung zwischen mechanischer Belastung und elektrischen Signalen (Jones et al. 1995).

1.2.3.3 Mechanotransduktion unter Beteiligung des Zytoskelettes

Die dynamische Balance zwischen kontraktile und starren Elementen des Zytoskeletts bestimmt die äußere Form einer Zelle. Das Zellskelett übt durch diese Kräfte Spannungen auf die Zelle aus (Harris et al. 1980). Die Wechselwirkungen des Zytoskeletts mit der Zellform wurden mit dem sogenannten „Tensegrity“-Modell formuliert (Watson 1991; Ingber 1993; Ingber et al. 1994). In einer Arbeit von Watson werden die prinzipiellen Eigenschaften eines möglichen Mechanotransduktionsapparates beschrieben. Die Anhaftung und folgende Ausbreitung der Zelle auf einem Substrat resultiert in der Erzeugung von mechanischen Kräften durch kontraktile, elastische und nichtkompressible Komponenten des Zytoskelettes. Für die Antwort auf eine Formänderung ist sowohl ein intaktes Zytoskelett notwendig, als auch das Vorhandensein eines „Mechanosensors“. Eine Voraussetzung, die der hypothetische Mechanosensor erfüllen muss, ist eine funktionelle Assoziation mit dem Zytoskelett, wahrscheinlich mit Aktin. Aktin konzentriert von außen einwirkende Kräfte auf

den Sensor. Die Struktur des Sensors soll mit multiplen membrandurchspannenden Domänen versehen sein, die durch elektrostatische Wechselwirkungen stabilisiert werden. Eine von außen einwirkende Kraft würde das elektrostatische Gleichgewicht verändern und so zu einer Konformationsänderung des Sensors führen. Diese Konformationsänderung beeinflusst dann die katalytische Domäne (Watson 1991).

Verschiedene Experimente legen nahe, dass der Mechanosensor mit dem Zytoskelett assoziiert sein muss. Eine Desintegration des Aktin-Zytoskeletts mit Cytochalasin D bewirkt eine mechanische Unempfindlichkeit der so behandelten Zellen, was sich an einem fehlenden Anstieg des cAMP nach Belastung zeigt (Watson et al. 1995).

Darüberhinaus haben Wang et al. gezeigt, dass die Verbindung von Endothelzellen zur extrazellulären Matrix über Integrin-Interaktionen einen Mechanismus für Veränderung der zellulären Antwort auf mechanische Reize darstellt (Wang et al. 1993). Des Weiteren vermitteln Interaktionen der Proteine der extrazellulären Matrix mit Osteoblasten und Osteoklasten über Integrine deren Differenzierung und Aktivität (Aarden et al. 1996).

1.2.4 Zelluläre Antwort auf mechanische Reizung

Die Antwort mittels intrazellulärer Signalkaskaden einer mechanisch stimulierten Knochenzelle lässt sich in drei wesentliche Phasen einteilen. Nach Reizung der Zelle erfolgen unmittelbare, frühe und späte Antworten:

1.2.4.1 Unmittelbare Antworten

Diese erfolgen innerhalb von Millisekunden bis Sekunden nach mechanischer Reizung. Zunächst wird die Phosphatidylinositol Phospholipase C aktiviert, was zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumionen-Konzentration führt (Jones et al. 1991). Dies führt auch zu einer interzellulären Kommunikation via Gap-Junctions. In der Folge öffnen sich Kaliumkanäle, was eine Hyperpolarisation der Zellmembran zur Folge hat. Diese wiederum ist die Ursache für einen weiteren Kalziumeinstrom aus dem extrazellulären Raum (Jones & Bingmann 1991). So ist das Resultat der unmittelbaren zellulären Antwort eine Erhöhung der Kalziumionen-Konzentration.

1.2.4.2 Frühe Antworten

Innerhalb von Minuten nach einer mechanischen Reizung beschreiben Harell et al. und Rodan et al. einen intrazellulären cAMP und cGMP Anstieg, sowie den Anstieg intrazellulären Kalziums (Harell et al. 1977; Rodan et al. 1995). Zu einem ähnlichen Zeitpunkt erhöht sich dann auch die intrazelluläre Konzentration von Prostaglandin E2 (Somjen et al. 1980). Eine weitere dann folgende Antwort ist der Anstieg von Stickstoffmonoxid (NO) innerhalb der ersten zwei Minuten nach mechanischer Deformation (Pitsillides et al. 1995; Johnson et al. 1996). Die Wirkung des kurzlebigen NO auf den Knochenstoffwechsel ist konzentrationsabhängig. Eine konstitutive NO-Konzentration stellt ein Proliferationssignal für Osteoblasten dar. Eine moderate NO-produktion führt zu einer gesteigerten Knochenresorption. Die Regulation der NO-Produktion geschieht über Kalzium/Kalmodulin auf Ebene der NO-Synthase oder findet auf transkriptioneller Ebene statt (Evans & Ralston 1996).

Eine weitere Folge der mechanischen Reizung stellt die Aktivierung von Kinasekaskaden (ERK1/ERK2) innerhalb von bis zu 8 Minuten nach Reizapplikation dar. Diese wird als allgemeines Proliferationssignal angesehen und wurde für Osteosarkomzellen erstmals durch Schmidt et al. bewiesen (Schmidt et al. 1998).

1.2.4.3 Späte Antworten

Zwei bis drei Stunden nach Belastung kommt es zu einer verstärkten Expression des Genabschnittes c-fos. Außerdem werden verstärkt TGF-beta und IGF-I synthetisiert (Raab-Cullen et al. 1994). Als weiterer später Effekt tauchen die Remodellierung des Aktinskelettes durch Aktinde- und Repolymerisierung auf. Letztendlich kommt es in Osteoblasten zu einer verstärkten Produktion von Matrixproteinen nach mechanischer Reizung.

Mögliche Signalkaskaden in der Mechanotransduktion**1. Überträger:**

Einzelner Überträger

Mehrere Überträger

2. 2nd Messenger:

Einzelner 2nd Messenger

Mehrere 2nd Messenger (was am wahrscheinlichsten ist)

3. Unmittelbare Effekte innerhalb 1 Sekunde:

Aktivierung der Phospholipase C

Kommunikation über Gap junctions

Aktivierung von Ionenkanälen

4. Freisetzung von Signalmolekülen wie NO durch Ca^{2+} **5. Frühe Effekte innerhalb von 1 bis 2 Minuten:**

Erhöhung des Arachidonäuremetabolismus

Erhöhung des cAMP durch Ca^{2+} oder PGE2

Erhöhung von cGMP durch NO

6. Späte Effekte von 2 Minuten bis 6 Stunden:

Aktivierung der Genexpression von z.B. c-fos, Egr-1/2

7. Sekundäre Effekte:Als Folge der aktivierten Genexpression (TGF- β , IGF)

Abbildung 1.2.4.3-1: Signalkaskade in der Mechanotransduktion, modifiziert nach Jones et al. 1995

1.3 Die phosphoinositol-spezifische Phospholipase C

Die phosphoinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC, PLC) mit ihren Isoenzymen der Gruppen β , γ , δ und ϵ ist eine Phosphodiesterase, die die polare Kopfgruppe von Inositollipiden abspaltet. Hierbei generiert sie die ubiquitären Botenstoffe („Second messenger“) Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). Die Isoenzyme der Phospholipase C arbeiten nicht jedes für sich, sondern in einer Art konzertierter Aktion, in der jede Isoform ihren speziellen Beitrag zu einem spezifischen Aspekt der zellulären Antwort leistet. Hierbei scheinen die verschiedenen Isoformen eine spezifische Rolle bei der Zellentwicklung und Signalübertragung zu übernehmen.

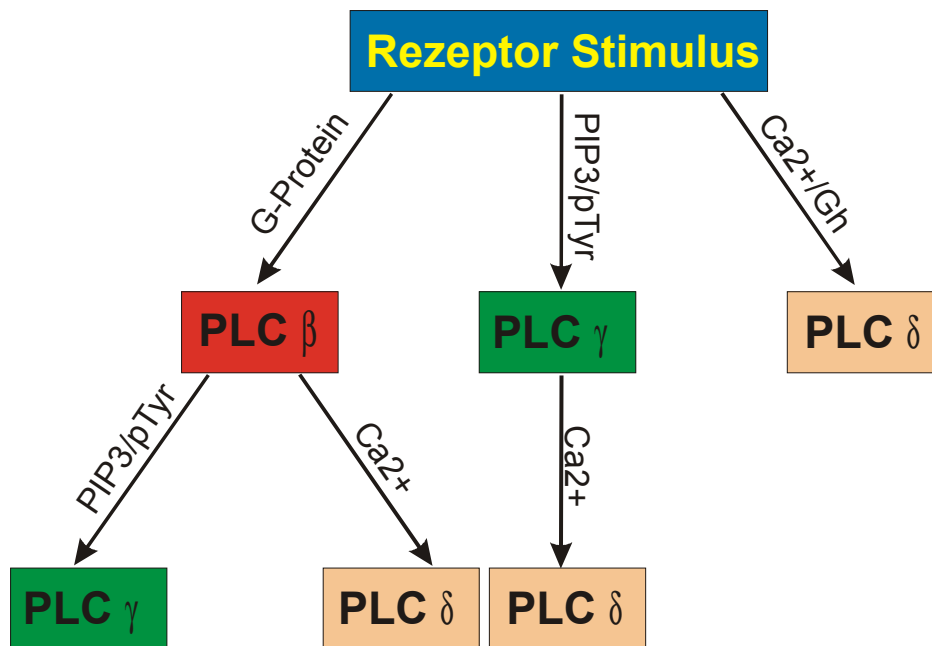


Abbildung 1.3-1: PLC-Aktivierungs-Hierarchie in der Signaltransduktion

Diverse Rezeptorstimuli führen zur Aktivierung von multiplen PLC Subtypen. G-Proteine aktivieren die PLC β , die ihrerseits über Phosphoinositoltrisphosphat (PIP_3) und Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (pTyr) die PLC γ und über Ca^{2+} die Isoform PLC δ aktiviert. Das direkte Ansprechen der PLC γ ist ebenfalls über PIP_3 und pTyr möglich, welches eine Ca^{2+} -gesteuerte Aktivierung der PLC δ zur Folge haben kann. Die Phospholipase C δ ist über Ca^{2+} und ein spezifisches G_{12} -Protein aktivierbar (Rebecchi & Pentyala 2000.)

Unter Rezeptorkontrolle hydrolysiert die Phospholipase C das stark phosphorylierte Phosphatidyl-4,5-Bisphosphat, wobei es zwei intrazelluläre Produkte erzeugt: Inositol-1,4,5-Trisphosphat, welches einen kalziummobilisierenden Botenstoff („Second messenger“) darstellt und Diacylglycerol, einen Aktivator der Proteinkinase C (Berridge 1984; Berridge 1993). Diese Rezeptoren werden durch Interleukine, Hormone und anderen Agonisten aktiviert.

Die Phospholipase C und ihre Isoenzyme werden seit den fünfziger Jahren erforscht. Die ersten Beobachtungen durch Hokin und etwas später durch Michell und weitere Gruppen führten zu der Erkenntnis, dass die Phospholipase C ein Schlüsselenzym im Phosphatidylinositolstoffwechsel und im Kalziumhaushalt der Zelle ist (Michell 1975; Hokin & Hokin 1953). Die direkte Verbindung der Phospholipase C zum Kalziumausstoß aus intrazellulären Speichern postulierte Streb (Streb et al. 1983). In der Folge wurden die vier Isoenzym-Untergruppen gefunden und deren cDNA isoliert (Rebecchi & Pentyala 2000; Rhee et al. 1992; Lopez et al. 2000). Gleichzeitig wurden Enzyme identifiziert, die die Phospholipase C regulieren. Hierzu gehören die GTP-bindende α_q -Untereinheit und die Protein-Tyrosinkinase. Hieraus entwickelten sich die heute gängigen Modelle der Phospholipase C Regulation durch Tyrosinkinasen und G-Proteine.

Die Isoenzyme der Phospholipase C sind Proteine mit mehreren Domänen. Sie besitzen ein Molekulargewicht zwischen 85kDa und 230kDa. Bislang sind vier β , zwei γ , vier δ und ein ε Isoenzym bekannt. Darüber hinaus existieren in Säugetieren noch weit mehr Splicealternativen. Die in niedrigeren Lebewesen identifizierten Formen ähneln der humanen Phospholipase C δ . Untersuchungen hierzu legen nahe, dass sich die heute bekannten Formen aus der δ -Isoform in primitiven Eukaryonten entwickelt hat. So entwickelten sich die β - und γ -Subtypen parallel zur Vervielfältigung anderer Signaltransduktionskomponenten der Zelle wie Phosphokinase C und die $G\alpha$ -Untereinheit der G-Proteine.

Zum jetzigen Zeitpunkt ist ein Großteil des Phosphoinositol / Kalzium-Signalweges erforscht. Zum Teil liegen hier dreidimensionale Bilder auf molekularer Ebene vor. Weitestgehend bekannt, zumindest auf zellulärer Ebene, ist auch, welche Isoenzyme mit welchen Regulatoren zusammenarbeiten. Größtenteils unverstanden ist jedoch das Zusammenspiel der verschiedenen Isoenzyme in lebenden Zellen oder Zellverbänden. Neueste Ergebnisse der Phospholipase C-Forschung deuten daraufhin, dass es eine höhere, noch unverstandene Ebene der Phospholipase C-Regulation auf zellulärer Ebene gibt.

1.3.1 Struktur der PLC

Die Sequenz der Phospholipase C enthält eine Abfolge von modular angeordneten Domänen. Diese gruppieren sich um die katalytische α/β -Formation, welche aus der charakteristischen X- und Y-Box besteht (Williams et al. 1996). Hierin enthalten sind auch eine Pleckstrin-Homologie-Domäne und eine einzelne C2-Domäne, die der Y-Box Region unmittelbar folgt. Außerdem finden sich EF-Hand Motive, sowie weitere regulierende Motive in den β - und γ -Isoenzymen, die in der δ -Isoform nicht vorkommen. Die hier aufgeführten Beschreibungen gelten der δ -Isoform. Sie ist die einzige eukaryote Form, deren dreidimensionale Struktur weitgehend bekannt ist.

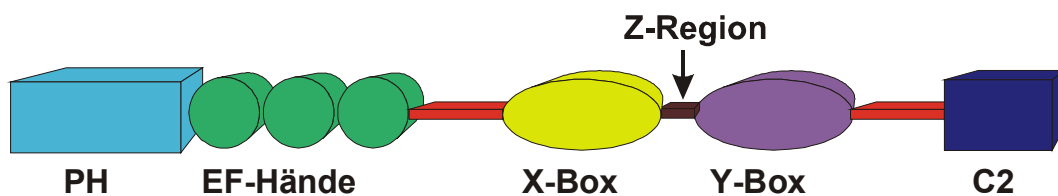


Abbildung 1.3.1-1: *Lineare Darstellung der Phospholipase C in der in Eukaryonten vorkommenden Form (Rebecchi & Pentylala 2000)*

1.3.1.1 Die katalytische α/β Formation

Die 147 Aminosäuren große X-Region und die 118 Aminosäuren große Y-Region bilden die katalytische Domäne der Phospholipase C (Essen et al. 1996; Essen et al. 1997). Diese Domäne besteht aus α -Helices und β -Faltblättern. Sie gleicht in ihrem Aufbau einer inkompletten Triosephosphatisomerase, welche räumlich eine tonnenform annimmt, deswegen die Bezeichnung „TIM-Barrel“. Die zwischen X- und Y-Region liegenden Z-Region hat keine katalytische Funktion, sie scheint jedoch wichtige regulatorische Funktion zu besitzen (Essen et al. 1996). Alle bekannten Formen der Phospholipase C in Eukaryonten und Prokaryonten katalysieren die Hydrolyse von Phosphatidylinositolbisphosphat in Inositoltrisphosphat und Diacylglycerol. Die Anwesenheit von Inositol ist unabdingbar, weil das Substrat an einem nukleophilen Angriff auf das enthaltene

Phosphat beteiligt ist. Hieraus entstehen wichtige Intermediärstrukturen (Bruzik et al. 1992; Hondal et al. 1998; Lin et al. 1990).

1.3.1.2 X/Y- verbindende Sequenz (Z-Region)

Die Z-Region, die zwischen X- und Y-Box in den verschiedenen Isoenzymen der Phospholipase C liegt, ist kaum konserviert. Sie übernimmt wahrscheinlich keine katalytischen Aufgaben, sondern hat ihre Bedeutung in der Regulation der verschiedenen Phospholipase C-Subtypen. Im γ -Isoenzym ist diese Region sehr groß. Sie enthält zwei SRC-Homologien, eine (SH)₂-Homologie und eine PH-Domäne, die wahrscheinlich an der intrinsischen Regulation dieses Isoenzymes beteiligt sind (Ellis et al. 1993).

1.3.1.3 Die PH-Domäne

Die PH-Domäne („Pleckstrin Homology“) wurde ursprünglich als ein neues Proteinmotiv mit 100 Aminosäuren beschrieben, welches sich zweimal im Protein Pleckstrin wiederfindet (Haslam et al. 1993; Mayer et al. 1993). Dieses Proteinmotiv wurde mittlerweile in mehr als 100 weiteren Proteinen gefunden (Lemmon et al. 1997). Sie können anhand ihrer Funktion in folgende Klassen eingeteilt werden: Serin/Threonin Proteinkinasen, Tyrosin Proteinkinasen, Phosphatidylinositol metabolisierende Enzyme und Zytoskelett-assoziierte Proteine. Die meisten eukaryonten PLCs enthalten eine 130 Aminosäuren lange PH-Domäne, allerdings gibt es hiervon auch Abweichungen. Die PH-Domäne bindet die polare Kopfgruppe von Phosphatidylinositolbisphosphat. Desweiteren besitzt sie Eigenschaften, die die Phospholipase C mit der Zellmembran verbinden (Garcia et al. 1995).

1.3.1.4 Die EF-Hand-Motive

Die verschiedenen Phospholipase C Isoformen besitzen bis zu vier EF-Hand-Motive. Jedes hiervon besteht aus einer Helix-Schleifen-Helix Struktur. Andere Proteine, die ebenfalls die EF-Hand Struktur besitzen, sind Kalmodulin und Troponin (Essen et al. 1996). Die Funktion der EF-Hand Domänen sind

bislang nicht geklärt. Fest steht jedoch, dass ein Ausfall dieser Region die Phospholipase C $\delta 1$ komplett inaktiviert (Nakashima et al. 1995). Aufgrund erster experimenteller Ergebnisse besteht Grund zu der Annahme, dass die EF-Hand Domäne eine Rolle bei der Regulation der Phospholipase C spielt (Rebecchi & Pentyala 2000).

1.3.1.5 Die C2-Domäne

Viele Proteine, wie auch die Phospholipase C, die in Signaltransduktionswegen eine Rolle spielen, besitzen das etwa 120 Aminosäuren lange C2-Motiv. Die C2-Domäne der Phospholipase C $\delta 1$ besteht aus acht antiparallel angeordneten β -Faltblattstrukturen, deren schleifenförmige Enden bis zu drei Kalziumionen binden können (Nalefski & Falke 1996). Die exakte Bedeutung dieser C2-Domänen ist unklar. Denn auch die Bindung zur GTP-beladenen αq -Untereinheit wird in der Phospholipase C $\beta 1$ durch sie vermittelt (Wang et al. 1999).

1.3.1.6 Das karboxyterminale Ende

Die PLC γ - und δ -Isoenzyme haben an ihrem karboxyterminalen Ende eine kurzes Peptid, das an die C2-Domäne angehängt ist. Hingegen ist das Ende in der Phospholipase C β -Familie aus ca. 400 Aminosäuren aufgebaut. Diese Sequenz ist sehr wichtig für die Membranbindung, die Lokalisierung im Zellkern und die Aktivierung durch G-Protein Untergruppen (Kim et al. 1996; Park et al. 1993; Wu et al. 1993a).

1.3.2 Die Phospholipase C β -Isoenzyme

In Säugetieren wurden vier Isoenzyme der Phospholipase C β gefunden. Neben diesen existieren weitere Splice-Varianten. Homologe Enzyme der Phospholipase C β konnten im Truthahn (PLC- βtk) (Waldo et al. 1996), in Drosophila (NorpA und OLC-21) (Bloomquist et al. 1988; Kim et al. 1995) und in weiteren

Organismen gefunden werden. Die Phospholipase C Isoformen werden durch heterotrimere GTP-bindende Proteine reguliert, ähnlich dem Adenylat-Zyklase Regulierungssystem (Exton 1996; Exton 1997). Die Regulation der Phospholipase C ist sehr intensiv studiert worden. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass jede Isoform eine eng umschriebene Funktion im Zellstoffwechsel einnimmt.

Die Phospholipase C β Isoenzyme sind sowohl intrazellulär als auch in den körpereigenen Geweben unterschiedlich verteilt.

Die Phospholipase C $\beta 1$ ist die am weitesten verbreitete Isoform. Ihre höchste Konzentration weist sie in bestimmten Hirnregionen wie in den Pyramidenzellen des Hippokampus auf (Gerfen et al. 1988; Homma et al. 1989; Mizuguchi et al. 1991). Die Phospholipase C $\beta 1$ existiert in zwei alternativen Splicevarianten PLC $\beta 1a$ und PLC $\beta 1b$ (Bahk et al. 1994). Keine der beiden Varianten kann jedoch im Magen oder den Nieren nachgewiesen werden.

Die PLC $\beta 2$ zeigt ihre stärkste Expression in Zellen hämatopoetischen Ursprungs. Sie wurde das erste Mal aus einer HL-60 cDNA Bibliothek isoliert (Park et al. 1992). Dieses Expressionsmuster bestätigt auch die entscheidende Rolle der PLC $\beta 2$ bei der Kommunikation von Leukozyten und in der Immunantwort (Rebecchi & Pentyla 2000).

Die höchsten Konzentrationen der PLC $\beta 3$ finden sich im Gehirn, in der Leber und der Ohrspeicheldrüse. Zuerst isoliert wurde sie aus dem Gehirn von Ratten (Jhon et al. 1993). Mäuseembryos mit einer Nullmutation für diese Isoform starben bereits 2,5 Tage nach Beginn der Embryogenese. Sie scheint eine entscheidende Rolle in dieser Entwicklungsphase zu spielen (Wang et al. 1998).

Auch die PLC $\beta 4$ findet sich hauptsächlich in neuronalem Gewebe. Ihre erste Isolation gelang aus Zellen des Kleinhirnes und der Retina. Ihr höchste Konzentration zeigt diese Variante in den Purkinjezellen des Kleinhirns und in den Zellen der Retina (Min et al. 1993a; Min et al. 1993b; Lee et al. 1994).

1.3.3 Kontrolle der PLC β durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Phospholipase C β -Isoformen arbeiten als Effektorenzyme für Rezeptoren, die zur Rhodopsin-Superfamilie gehören. Diese besitzen sieben transmembranäre Segmente. Sie werden durch verschiedene Stimuli wie Photonen, kleine

Duftmoleküle und große Proteine aktiviert und benötigen eine spezifische Kombination der $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ Untereinheiten der G-Proteine, um an den Effektor anzukoppeln. Im Standardmodell der Aktivierung der Phospholipase C durch G-Proteine stimuliert die Bindung eines Agonisten den rezeptorkatalysierten Austausch gebundenen GDPs gegen GTP. Dies geschieht an der α -Untereinheit des Heterotrimers. Die GTP-beladene Untereinheit dissoziiert dann in der Membranebene. Anschließend bindet entweder die α -Untereinheit, das $\beta\gamma$ -Heterodimer oder beide an die Phospholipase C β , wodurch deren katalytische Aktivität verstärkt wird. Hierdurch wird der ursprüngliche Rezeptorstimulus verstärkt (Clapham & Neer 1997; Hepler et al. 1993; Jiang et al. 1994; Wu et al. 1993b).

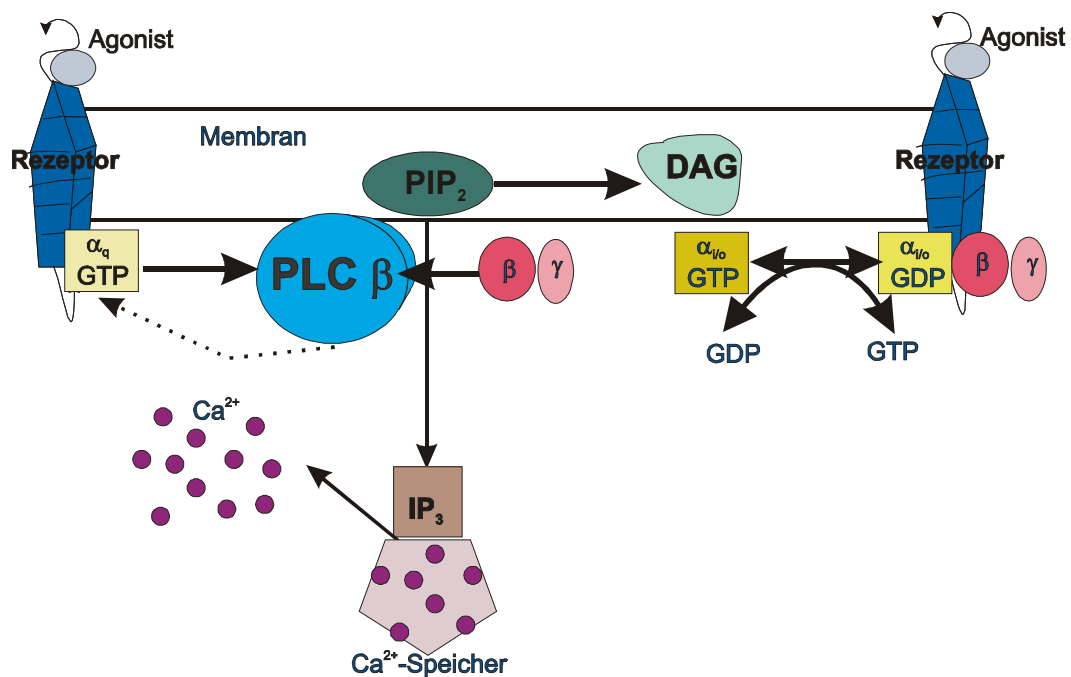


Abbildung 1.3.3-1: Regulation der PLC β durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Rebecchi & Pentyala 2000)

Die Abbildung zeigt die Regulation der Phospholipase C β durch die G_q und $G_{i/o}$ Proteine. Die α_q Untereinheit von G_q aktiviert die PLC direkt. Ebenso die $\beta\gamma$ Untereinheiten, die von $G_{i/o}$ abgespalten werden. Die Hydrolyse von Inositolbiphosphat (PIP_2) führt zur Bildung von Diazylglyzerol (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP_3), das die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern generiert.

1.3.4 Die Rolle der Phospholipase C in der Mechanotransduktion

Erste Untersuchungen zur Bedeutung der Phospholipase C bei der Umwandlung mechanischer Reize in elektrische und biochemische Signale führte Furlanut an Darmzellen des Meerschweinchens durch. Hier konnte er nach erfolgter Dehnung der Zellen des Dickdarmes die Aktivierung der phosphoinositol-spezifischen Phospholipase C feststellen (Furlanut et al. 1977).

In primären bovinen Osteoblasten findet sich eine Aktivierung der PLC ca. 80 ms nach mechanischer Dehnungsbelastung (Jones et al. 1991). Die dadurch gebildeten sekundären Botenstoffe Inositoltrisphosphat und Diacylglycerol führen zur Aktivierung des MAP-Kinase-Transduktionsweges und zum Einstrom von Kalzium aus dem extrazellulären Raum in die Zelle.

Aktivierungen von Elementen dieses Signaltransduktionsweges nach mechanischer Stimulierung konnten in verschiedenen Studien gezeigt werden. So konnte sowohl in Chondrozyten (Lane et al. 2000), in Endothelzellen (Yegutkin et al. 2000) als auch in Osteoblasten (Chen et al. 2000) eine Aktivierung dieses Pfades nach Belastung der Zellen mittels Scherkräften durch Flüssigkeitsströme („Fluid shear stress“) nachgewiesen werden. Auch die über diverse Dehnungsapparaturen auf Zellen einwirkende Kräfte führen zur Aktivierung der Phospholipase C und der MAP-Kinase. Sowohl neonatale Rattenkardiomyozyten als auch glatte Muskelzellen der Luftwege zeigen eine solche Aktivierung (Hai 2000; Ruwhof et al. 2001).

Der Konzentrationsanstieg von „Second messenger“- Pfaden nach Aktivierung der Phospholipase C in der zellulären Antwort auf mechanische Stimulation ist für weitere Zelltypen bekannt. So wurde die Aktivierung der Phospholipase C mit nachfolgender Steigerung der zytosolischen Konzentration an Inositoltrisphosphat und Diacylglycerol in verschiedenen Zelltypen gezeigt. In Experimenten mit Endothelzellen (Brophy et al. 1993), Zellen des Myokards (Dassouli et al. 1993) und an Zellen der glatten Muskulatur (Matsumoto et al. 1995) konnte eine Aktivierung des oben genannten Pfades gefunden werden.

Andere Studien haben gezeigt, dass aortale Endothelzellen nach Belastung einen Anstieg von Diacylglycerol zeigen. Dieser zweiphasige Anstieg kann jedoch nicht eindeutig auf eine Produktionsquelle zurückgeführt werden. Der frühe Anstieg des

DAG wird von Evans et al. jedoch auf eine Aktivierung des Phospholipase Pfades zurückgeführt, wohingegen der zweite Gipfel durch die Aktivierung der Phospholipase D ausgelöst wird (Evans et al. 1997).

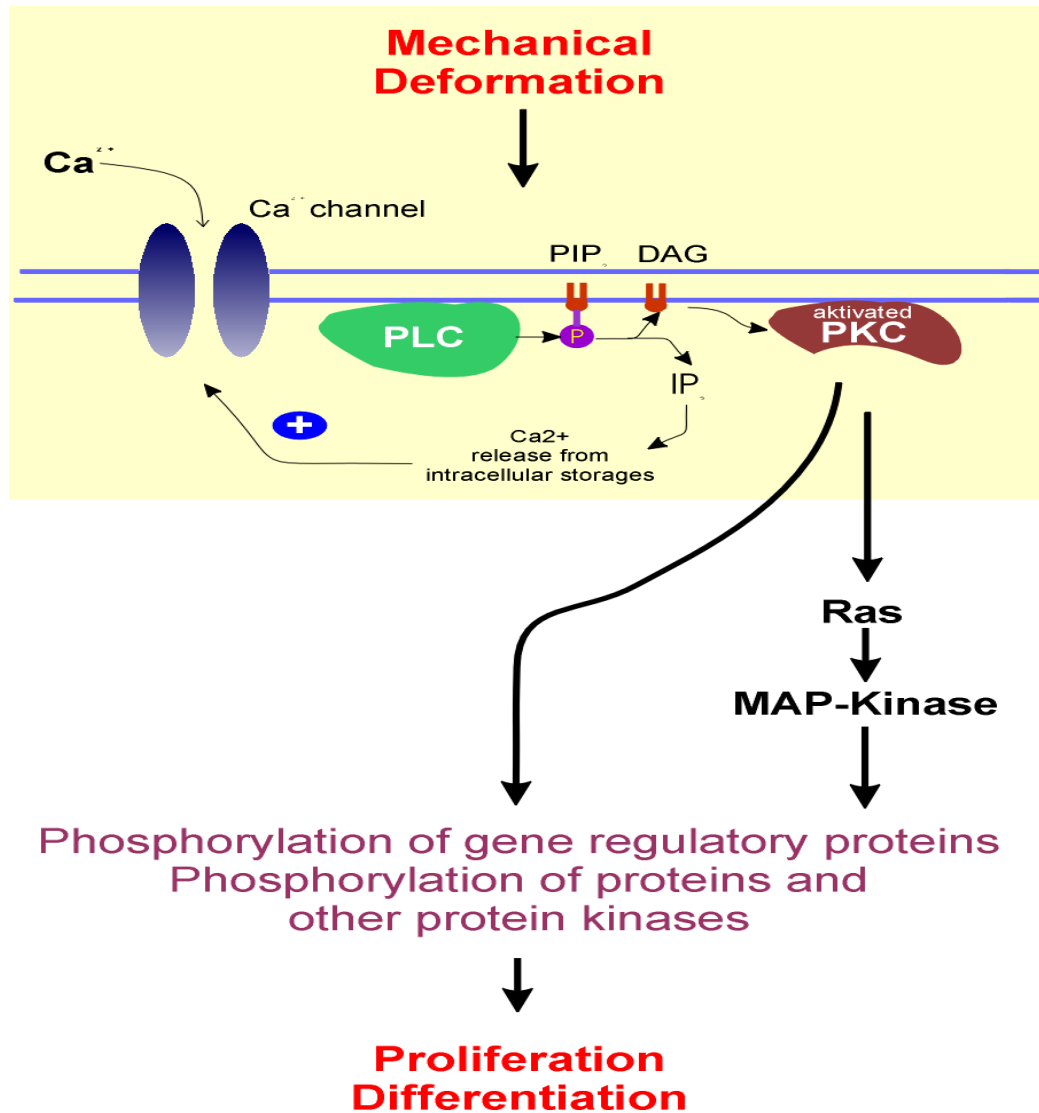


Abbildung 1.3.4-1: Mechanotransduktionsmechanismus nach mechanischer Belastung von Osteoblasten

Nach Dehnung der Zellen kommt es zur Aktivierung der PLC und zur Bildung der sekundären Botenstoffe Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diazylglyzerol (DAG). DAG aktiviert die MAP-Kinase-Kaskade über eine Protein-Kinase C (PKC), was letztendlich zu Proliferations- und Differenzierungsvorgängen führt. IP₃ mobilisiert Kalzium aus intrazellulären Speichern, was einen Einstrom von Ca²⁺ aus dem Extrazellulärraum über einen Kalziumkanal zur Folge hat. (Nach Jones et

al. 1991, B. Bromme und J. Tenbosch, Experimentelle Orthopädie und Biomechanik, Marburg, persönliche Mitteilung.)

1.4 Dehnungsapplikation

Experimente mit Zellkulturen erfordern für eine gute Reproduzierbarkeit genaue Definitionen der auf sie applizierten Kräfte. Des Weiteren sollten sich die Reize in einem physiologischen Rahmen bewegen. Die Frage, welche Größenordnung eines Reizes physiologisch ist, beschäftigt die Wissenschaft seit Jahren. Mechanische Belastung wird durch einige unabhängige Parameter charakterisiert. Dazu gehören die Größe der Belastung, Anzahl der Belastungszyklen und die Frequenz mit welcher die Kraft appliziert wird.

Lanyon legte mit seinem Hühnchenmodell erstmals eine minimale Anzahl von Dehnungszyklen fest, die zu einer Zunahme der Mineraldichte im Knochen notwendig ist (Lanyon 1984). Von Bedeutung erscheint nicht nur die Anzahl der Belastungszyklen sondern auch die Größenordnung der Längenzunahme. Hierfür wurde die anteilmäßige Änderung der Länge an der Gesamtlänge der Zelle festgelegt. Für diese dimensionslose Größe wurde die Einheit ϵ = Strain festgelegt. Ein Strain bedeutet hierbei die Längenänderung der Zelle um 100%. Dieses reflektiert jedoch nicht die physiologischen Größen der Zelldehnung. Diese liegen im Bereich von $\mu\epsilon$. Ein $\mu\epsilon$ bedeutet eine Längenänderung von 0,0001%.

1.4.1 Physiologische Knochenbelastung

Eine physiologische Belastung wird durch eine tägliche Belastung von 36 Zyklen mit einer Frequenz von 0,5 Hz und 2000 $\mu\epsilon$ simuliert. Hierdurch steigern die belasteten Knochenzellen ihre Syntheserate. Die minimale Belastung, die gerade noch eine Knochenresorption verhindert, liegt bei vier täglichen Zyklen und einer Dehnung von 1000 $\mu\epsilon$. Absolut notwendig für den Knochenerhalt und das Knochenwachstum ist eine dynamische Belastung. Eine statische Belastung mit der gleichen Dehnungsstärke führt nicht zu einer erhöhten Syntheserate des Knochens (Lanyon 1984; Hert et al. 1971).

In vivo Versuche mit Dehnungsmessstreifen konnten die physiologische Dehnungsbelastung von menschlichem Knochen während Aktivitäten wie Bergauf- und Bergablaufen und beim Sprinten messen. Diese liegen in ihrer Größenordnung dreifach über den Belastungen, die beim normalen Gehen auftreten (Burr et al. 1996; Lanyon & Smith 1970; Lanyon et al. 1975).

Egal, ob man die knöcherne Belastung in einem galoppierenden Pferd oder einer fliegenden Gans misst, beträgt die Spitzenbelastung des Knochens 2000-3500 $\mu\epsilon$ (Rubin & Lanyon 1984).

Frost machte darauf aufmerksam, dass es eine recht große Differenz zwischen der üblichen Belastung in kortikalem Knochen (2000-3500 $\mu\epsilon$) und der für eine Fraktur „notwendigen“ Belastung von ca. 25000 $\mu\epsilon$ gibt. Er schlug eine minimale effektive Belastung („minimum effective strain“) MES vor. Oberhalb dieser kommt es zu adaptiven Umbauvorgängen des Knochens. Frost postulierte anhand von vergleichenden Studien eine Bandbreite der MES von 1500 $\mu\epsilon$ bis 3000 $\mu\epsilon$. Reize innerhalb dieser Grenzen rufen keinerlei Veränderung hervor, selbst wenn der Reiz regelmäßig und dauerhaft appliziert wird. Wiederholte Belastung führt jedoch schon bei kleiner Reizgröße zur adaptiven Knochenanpassung (Frost 1988).

Etwas anders verhalten sich hier die Belastungswerte, die in Osteoblasten- und Osteosarkomzellkulturen zur Erhöhung der Proliferationsrate führen. So konnten von Jones Werte zwischen 3000 $\mu\epsilon$ und 4000 $\mu\epsilon$ bei einer täglichen Belastung mit 30 Zyklen bei einer Frequenz von 1Hz bestimmt werden (Jones et al. 1991).

Turner fasst in einer Arbeit die grundlegenden Voraussetzungen für die mechanische Stimulation von Knochenzellen zusammen, die zu einem adaptiven Umbau führen (Turner & Pavalko 1998). Diese sind:

1. Dynamik
2. kurze Dauer der Reize
3. Akkomodation des Knochens an den mechanischen Reiz

1.5 Untersuchung mittels Antisense-RNA

Die präzise Kontrolle der Genexpression ist ein unschätzbares Werkzeug bei der Untersuchung physiologischer Prozesse. Anwendungen für die regulierbare Genexpression beinhalten die steuerbare Überexpression von toxischen oder teratogenen Genen, die Gentherapie sowie die Antisense RNA Expression (Jaenisch 1988).

Für Zellkulturen wurden durch Steroide induzierbare Systeme beschrieben, mit denen Genexpression gezielt gesteuert werden kann. Des Weiteren wurden Tetrazyklin-regulierte Systeme etabliert, bei welchen die Expression des gewünschten Gens in Abwesenheit des Antibiotikums Tetrazyklin gesteigert wird (Gossen & Bujard 1992; Furth et al. 1994). Dieses System wurde auch in transgenen Mäusen benutzt (Furth et al. 1994; Shockett et al. 1995). Es besitzt jedoch auch Nachteile. Unter Anderem sind hier die dauernde Behandlung mit Tetrazyklin und die lange Halbwertszeit des Antibiotikums zu nennen.

Als eine Alternative hierzu beschreiben No et al. das Insektenhäutungshormon Ecdysone als potentiellen Induktor einer Genexpression. Die Wirkung des Hormones wird durch den funktionellen Ecdysone-Rezeptor (EcR) und ein Produkt des Ultraspiralgens (USP) vermittelt (Yao et al. 1993). Die Vorteile dieses Systems beinhalten die lipophile Struktur des Hormons, welches eine optimale Penetration des Hormones oder seiner Analoga ins Zellinnere ermöglicht. Außerdem sind hier die kurze Halbwertszeit und die guten pharmakologischen Eigenschaften zu nennen, die einer Hormoneinlagerung vorbeugen und die Beseitigung des Stoffes aus dem Körper beschleunigen (No et al. 1996). Außerdem berichtet No, dass bislang keine Beeinflussung des Zellstoffwechsels von Säugerzellen durch das Insektenhormon bekannt ist.

Antisense RNA-Expression wurde als generelle Methode für die Inhibition spezieller Gene und ihrer Genprodukte in mehreren Studien beschrieben (Izant & Weintraub 1984; Enomoto et al. 1993; Wewer et al. 1994). Hierzu wurden in den genannten Studien unterschiedlich große RNA Moleküle verwendet (Antisense mRNA), welche komplementäre Sequenzen zu einem Teil der mRNA des zu inhibierenden Gens besitzen (Sense mRNA). So soll die Translation der Ziel-

mRNA durch komplementäre Bindung von Sense und Antisense mRNA verhindert werden.

Es gibt bis heute nur relativ wenige Studien, die sich mit der Inhibierung der Phospholipase C und ihrer Isoenzyme mittels Antisense befassen.

Nebigil et al. untersuchten die Bedeutung der Isoenzyme β, γ und δ in FTO-2B Rattenhepatozyten (Nebigil 1997). Sie transfizierten Rattenhepatozyten in Zellkultur mit induzierbaren Antisense-produzierenden Vektoren unter für diesen Zelltyp spezifischer Promotorkontrolle. Diese beinhalteten Antisense-Sequenzen gegen die katalytischen Domänen der verschiedenen Isoenzyme. Es wurden Konstrukte hergestellt, die gruppenspezifisch alle Enzyme einer Untergruppe inhibierten, die anderen Isoenzyme jedoch nicht tangierten. Dies erbrachte eine signifikante Reduktion der intrazellulären second messenger, der MAP-Kinase. Außerdem führte es zu einer deutlichen Einschränkung der Zellproliferation. Die anderen Isoenzyme wurden durch die selektive Antisensebildung in ihrer Aktivität nicht reduziert. Dies deutet daraufhin, dass die verschiedenen Isoenzymgruppen eigene, zum Teil parallele, Signalkaskaden benutzen. Der Grad der Suppression bewegte sich zwischen 25 und 85 Prozent (Nebigil 1997).

Haley et al. bringen mittels eines Mikroinjektors ein Antisense Konstrukt in den Zellkern. Hierzu konstruieren sie einen Antisense-Vektor gegen Phospholipase C $\beta 1$ und $\beta 4$, welcher unter CMV-Kontrolle steht. Die Reduktion der Menge des Zielenzym wurde durch dessen immunzytochemische Färbung nachgewiesen und bewegte sich zwischen 38% bis 70%. Die Isoenzyme $\beta 2$ und $\beta 3$ wurden durch die Antisense Produktion nicht beeinflusst (Haley et al. 2000).

Schnabel et al. untersuchen die Bedeutung der Phospholipase C $\beta 3$ bei der kardialen Hypertrophie durch Wachstumsfaktoren wie IGF-I an Kardiomyozyten von Ratten. Diese Arbeitsgruppe inhibiert das oben genannte Isoenzym durch zwei 20 Basen lange Antisense-Oligonukleotide. Dies führt durch eine nahezu totale Inhibition der PLC $\beta 3$ zu einer fehlenden Aktivierung von c-myc, einem typischen Endprodukt nach Stimulierung dieser Zellen mit IGF-I (Schnabel et al. 2000).

Die Bedeutung der Phospholipase C für Signaltransduktionswege im Zellkern erforschten Cocco et al. und Manzoli et al. mittels Antisense Oligonukleotiden

gegen die Phospholipase C $\beta 1$ (Cocco et al. 1999; Manzoli et al. 1997; Manzoli et al. 1999).

Xie und Bikle untersuchen die Bedeutung der Phospholipase C $\gamma 1$ im rezeptorvermittelten Signaltransduktionsweg des Vitamin D3 in Keratinozyten. Hierzu benutzen sie 4,6kB große Antisense Fragmente in BamH1 Vektoren, um die Produktion der PLC $\gamma 1$ zu supprimieren. Eine stabile Transfektion von Keratinozyten mit dem oben genannten Antisense enthaltenden Vektor ergab einen deutlich geringeren Anstieg intrazellulären Kalzium und IP3 nach Vitamin D3 Applikation. Dies deutet auf eine Rolle der Phospholipase C $\gamma 1$ in dieser Signaltransduktionskette hin (Xie & Bikle 2001; Xie & Bikle 1999).

1.6 Klinische Relevanz

Die Osteoporose stellt ein sehr komplexes Krankheitsbild dar. Die bis heute verstandene Ätiologie misst dem Verlust der Sexualhormone, im Speziellen bei Frauen in der Menopause, ein großes Gewicht bei. Außerdem soll das genetisch determinierte, im Vergleich zum Mann, niedrigere Körpergewicht mit entsprechend geringerer Muskelmasse eine wichtige Rolle spielen. Weiterhin spielen nutritive Faktoren wie eine kalziumarme und phosphatreiche Kost und gesundheitsschädigendes Verhalten wie Zigaretten- und Alkoholkonsum eine wichtige Rolle. Bei der Osteoporose kommt es zu einer Reduktion der Knochenmasse und einer Veränderung der knöchernen Mikroarchitektur. Beim ständig stattfindenden Knochenumbau („Bone remodeling“) kommt es bei der Osteoporose zu einer Dysbalance von Knochenresorption und Knochenneubildung (Shinar & Rodan 1993). Hieraus resultiert eine erhöhte Frakturneigung des Knochens. Der Schlüssel zum Verständnis der Pathogenese dieser Erkrankung liegt in der Klärung der Ursachen von Knochenformation, Knochenabbau und der Verbindung dieser zwei Prozesse.

Die vor Allem in höherem Alter auftretende Immobilitätsosteoporose ist eine typische sekundäre Osteoporose. Diese Form der Osteoporose ist aktuell geworden, nachdem der Astronaut Glenn nach einem Aufenthalt in der Schwerelosigkeit in seinem Bad gestürzt ist. Die anschließend durchgeführten

Röntgenuntersuchungen (unter Anderem der Lendenwirbelsäule) zeigten einen Verlust an Knochendichte. Die Knochendichteminderung auf dem Boden von Inaktivität konnte durch sogenannte „Bedreststudies“ belegt werden. Physikalische Aktivitäten führten in verschiedenen Studien bei osteoporotischen Patienten zu einer signifikanten Zunahme des Mineralgehaltes im Knochen (Simkin et al. 1987; Smith & Raab 1986). Die Trainingsprogramme der physikalischen Therapie tragen heute zur Prävention von Frakturen, Stabilisierung des Knochens und zur verbesserten Bewegung durch Gangschulung maßgeblich bei.

Ein besseres Verständnis der zellulären Ereignisse bei mechanischer Belastung von Knochenzellen ist wichtig. Zur Zeit existieren hier nur recht ungenaue Vorstellungen. So sind zwar Ätiologie und Klinik sowie die histopathologischen Vorgänge bei der Osteoporose bekannt. Das Verständnis der molekularen Mechanismen bietet jedoch möglicherweise einen neuen Ansatz für zukünftige Therapien. Bei genauem Verständnis können anhand der pathologischen Mechanismen Konzepte für die Therapie und der noch bedeutsameren Prävention der Osteoporose entwickelt werden.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

In vielen verschiedenen Untersuchungen konnte die Aktivierung der phosphoinositol-spezifischen Phospholipase C nach mechanischer Belastung in unterschiedlichsten Zelltypen nachgewiesen werden. Es gibt jedoch zur Zeit keinen Hinweis in der Literatur welches der bekannten Isoenzyme der Phospholipase C bei der Umwandlung des von außen applizierten mechanischen Reizes in eine zelluläre Antwort involviert ist.

Ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung der Mechanotransduktion in Osteoblasten stellt die primäre bovine Osteoblastenkultur dar, die auf physiologische Dehnungsreize sehr sensitiv in Form einer erhöhten Proliferationsrate reagiert. Dieses Modell wurde im Labor der experimentellen Orthopädie und Biomechanik in Marburg etabliert. Hierzu wurde ein alternatives Osteosarkomzellmodell entwickelt, welches die gleiche mechanische

Empfindlichkeit bietet, jedoch über zahlreiche Schwierigkeiten, die bei der Primärkultur existieren, hinweghilft. Ein Vergleich der Dehnungssensibilität von Osteosarkomzellen und primären bovinen Osteoblasten fehlt bislang in der Literatur. Durch Experimente in unserem Labor konnten das Dehnungsverhalten beider Zelltypen charakterisiert werden.

Aufbauend auf Versuchsergebnissen von verschiedenen Doktoranden des Labors und ausgehend vom aktuellen Stand der Wissenschaft wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, das noch unvollständige Bild, das wir von der Mechanotransduktion haben, zu ergänzen. So baut ein Großteil der vorliegenden Arbeit auf den Untersuchungen zur Expression der phosphoinositol-spezifischen Phospholipase C durch Dr. J. Tenbosch und Dr. med. M. Hoberg auf.

Die Arbeit gliedert sich in die folgenden Abschnitte:

1. Identifikation einer mechanosensiblen und einer nicht mechanosensiblen Osteosarkomzelllinie mittels Dehnungsexperimenten
2. Transfektion dieser Zelllinien mit Plasmiden, die in vitro steuerbar Antisense mRNA gegen verschieden Isoenzyme der Phospholipase C exprimieren können
3. Untersuchungen zur Antwort dieser genetisch veränderten Zellen auf physiologische Dehnungsreize

Das System zur gesteuerten Expression von Antisense mRNA soll eine gezielte Ausschaltung der verschiedenen Isoenzyme der Phospholipase C erlauben. Diese Ausschaltung, umgangssprachlich „Knockout“ genannt, und deren biologische Auswirkung werden im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Lösungen und Puffer

Acrylamidstammlösung	Polyacrylamid	38% (w/v)
	N, N	2% (w/v)
	'-Methylenbisacrylamid	
Gel-Probenpuffer, 10fach konzentriert	EDTA	20mM
	Bromphenolblau	0,25% (w/v)
	Xylencyanol	0,25% (w/v)
	Saccharose	40% (w/v)
PBS	NaCl	136mM
	KCl	2,6mM
	Na ₂ HPO ₄	8mM
	KH ₂ PO ₄	1,1mM
	pH 7,4	
TE	Tris / HCl	10mM
	Borsäure	1mM
	EDTA	20mM
	pH 8,3	
TBE (10fach)	Tris / HCl	1mM
	KCl	1mM
	NaCl	20mM

2.1.2 Oligonukleotide

PLCbeta 1-1 AS	5'- CGGAATTCCAGCCCAGATGAGCC CAGATGGCCGGGG -3'
PLCbeta 1-2 AS	5'- CGGGGTACCCTCCTAAAATAATT GGAGTAACAATA -3'
PLCbeta 2-1 AS	5'- CGGAATTCCGCACCATGTCTCTG CTCAACCCTGTCC -3'
PLCbeta 2-2 AS	5'- CGGGGTACCCAGTATAAGTAGTA GCCCTTAGGATCC -3'
PLCbeta 3-1 AS	5'- CGGAATTCCAACATGGAGGTGGA CACACTGGACAT -3'
PLCbeta 3-2 AS	5'- CGGGTACCCACCACCACCGTCAT CAGCTTCTCCTCCAG-3'
Ecdysone Forward Primer	5'- CTCTGAATACTTTCAACAAGTTA C -3'

2.1.3 Bakterienstamm

Escherichia coli DH5α	
-----------------------	--

2.1.4 Plasmide

pIND(SP1)	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
pVgRXR	Invitrogen (Groningen, Niederlande)

2.1.5 Zelllinien

U-2/OS	Ponten and Saksela 1967
MG-63	Billiau et al. 1977

2.1.6 Nährmedien

RPMI 1640 (PAA)		
-----------------	--	--

RPMI 1640 (Sigma Aldrich) Chargennummer: 69H2324		
LB-Medium	Pepton, tryptisch verdaut Hefeextrakt NaCl pH 7,5	1% (w/v) 0,5% (w/v) 1% (w/v)
LB Agar	LB-Medium Agar-Agar	1,5% (w/v)
Fötales Kälberserum (FCS) (Boehringer Mannheim) Chargennummer: 210471		
L-Glutamin		
Penicillin / Streptomycin (PAA) Chargennummer: L11129-593		
Vitamin C-Phosphat (Wako Chemical Industries, Japan)		5mg/ml in PBS
G418-Sulphate (Genitacin) (Life Technologies)		
Zeocin (PAA)		

2.1.7 Antikörper

Anti-PhospholipaseC beta1 (Santa Cruz Biotechnologies)
Anti-PhospholipaseC beta2 (Santa Cruz Biotechnologies)
Anti-PhospholipaseC beta3 (Santa Cruz Biotechnologies)
Anti-Rabbit-Antikörper; mit alkalischer Phosphatase markiert (SIGMA)

2.1.8 Geräte

Begasungsbrutschrank	für die	Heraeus Instruments
Zellkultur		
Sterilwerkbank		Gelaire BSB

Gewebekulturschalen für die Zellkultur Ø 5,7cm	Nalge Nunc International
Gewebekulturflasche 250ml	Greiner Labortechnik
Gewebekulturflasche 50ml	Greiner Labortechnik
9-Loch-Zellkultivierungsplatten für die Dehnungsmaschine	(Jones et al. 1993)
Sterilfilter mit 0,22µm Porengröße	Schleicher & Schuell
Zellzähler Coulter Z1	Coulter
Zellzähler CASY	
Autoklav	Guwina Berlin
Sterilisationsofen	Heraeus Instruments
Vier-Punkt-Dehnungsmaschine mit Motor und Steuereinheit	(Jones et al. 1993)
Vier-Punkt-Dehnungsmaschine mit manuellem Antrieb	(Jones et al. 1993)
PCR-Gertät	Perkin-Elmer
Zentrifuge	Eppendorf 5415 C
Zentrifuge	Heraeus Christ Biofuge A
Zentrifuge	Beckmann J2-21 M/E Hettich Universal
Rotoren für Zentrifuge Beckmann	JA20 Beckmann
Phasenkontrastmikroskop	Olympus CK2 (BH2-RFCA)

2.1.9 Sonstige Materialien

Röntgenfilm

Scientific Imaging Film BIOMAX TM MS	Kodak
--	-------

Western Blot

Western-Blot Apparatur	BioRad
Western Blotting Kit AURORA TM	ICN

Transfektion

SuperFect TM Transfection Reagent	Qiagen
Effectene TM Transfection Reagent	Qiagen

Anmerkungen:

Alle Geräte, die zur Standardausstattung eines Labors zählen, wurden im Teil Material nicht aufgezählt.

Es wurden Chemikalien und Enzyme der folgenden Firmen benutzt:

Biolabs, BioRad, Boehringer Mannheim, Calbiochem, Clontech, Falcon, Larry Fisher, Fluca, Gibco BRL, Invitrogen, Molecular Probes, PAA Laboratories, Santa Cruz Biotechnologies, Serva, Sigma chemicals

2.2 Zellkultur

2.2.1 Zellkultivierung

Die Kultivierung von Osteosarkomzellen findet in speziell hierfür entwickelten und erprobten Kulturflaschen und Petrischalen statt.

Da Osteosarkomzellen einen nur sehr niedrigen Anspruch an ihre Umgebung haben ist die Kultivierung mit dem Standardmedium RPMI 1640 möglich. Diesem werden 10% FCS (Fötales Kälberserum), 2mM L-Glutamin und 10µg/ml Medium Vitamin C-Phosphat zugesetzt. Die Kultivierung der Osteosarkomzellen erfolgt in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C mit einem Zusatz von 5%CO₂, welches zur Einstellung des pH-Wertes benötigt wird. Die Arbeit in der Zellkultur findet unter sterilen Bedingungen statt. Die Arbeitsweise orientiert sich im Wesentlichen an den Vorschlägen von Lindl und Bauer (Lindl & Bauer 1994).

2.2.2 Passagieren

Wenn die in Kultur befindlichen Osteosarkomzellen eine 80-100%-ige Konfluenz aufweisen müssen sie passagiert werden. Dies geschieht mit Hilfe der Trypsinierung.

Hierzu wird zunächst das Nährmedium von den Zellen abgesaugt. Die Zellen werden jetzt zweimal mit 37°C warmem PBS gewaschen, um die Trypsinierung störende zweiwertige Ionen von der Kulturoberfläche zu entfernen. Anschließend wird eine der Flaschengröße entsprechende Menge Trypsin/EDTA (ca. 2ml Trypsin/83cm² Zellkulturoberfläche) auf die Zellen gegeben. Jetzt werden die Kulturflaschen für ca. 3 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Ablösen der Zellen wird

dann unter dem Mikroskop kontrolliert. Um die Proteasewirkung des Trypsins zu stoppen wird die vierfache Menge Kulturmedium zu dem Trypsin-Zellen-Gemisch gegeben. Jetzt können die Zellen bei 1000 U/min in der Zentrifuge 10 Minuten sedimentiert werden. Anschließend wird das Medium-Trypsin-Gemisch abgesaugt und das Zellpellet in einer entsprechenden Menge Medium resuspendiert. Nun kann sich zur Bestimmung der Zellzahl auch eine Zählung anschließen. Dann können die Zellen in einer entsprechenden Verdünnung wieder ausgesät werden.

Material

Trypsin/EDTA	Trypsin 0,05% (v/v) EDTA 0,02% (w/v) aufgenommen in PBS
--------------	---

2.2.3 Kryokonservierung

Zur Langzeitlagerung der Osteosarkomzellen werden diese in flüssigem Stickstoff bei -196°C eingefroren.

Hierzu wird von den in Kultur befindlichen und entsprechend konfluenten Zellen das Medium abgesaugt und die Zellen mit auf 37°C im Wasserbad erwärmtem PBS zweimal gewaschen. Dann werden die Zellen von ihrer Unterlage abtrypsinisiert (2ml Trypsin/83cm² Zellkulturoberfläche) und das Ablösen der Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert. Um das Trypsin von den Zellen zu entfernen werden jetzt die Zellen 10 Minuten mit 1000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert und das Trypsin-Medium-Gemisch vom Zellpellet abgesaugt. Jetzt werden die Zellen in wenig Kulturmedium resuspendiert und gezählt. Die Zellzahl wird anschließend entsprechend dem Ergebnis der Zählung auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml Einfriermedium eingestellt. Direkt vor dem Einfriervorgang wird ein Volumen Einfriermedium (80% RPMI-Medium und 20% DMSO) zu einem Volumen Zell-Suspension gegeben. Anschließend werden die Zellen in speziell für die Kryokonservierung vorgesehene Kryoröhrchen mit einem Volumen von 1,8ml gegeben (Endkonzentration von 10% DMSO). Der Einfriervorgang beginnt mit einer langsamen Phase, in der die Zellen in einen Behälter mit Isopropanol gestellt werden. In diesem beginnt die Abkühlung mit

ca. 1°C pro Minute bis auf –80°C. Nach 12 Stunden bei –80°C können die Zellen dann in den Behälter mit flüssigem Stickstoff überführt werden.

Zum Auftauen der Zellen werden diese direkt aus dem Behälter mit flüssigem Stickstoff in einem Wasserbad mit 37°C erwärmt. Sobald die Zellen aufgetaut sind werden sie in Medium resuspendiert und bei 1000 Umdrehungen/min sedimentiert. Das Zellpellet wird dann in einer entsprechenden Menge Medium wieder aufgenommen und die Zellen werden in den dafür vorgesehenen Gefäßen ausgesät und im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Da sich noch Reste des Einfriermediums auf den Zellen befinden, sollte nach einem Tag ein Mediumwechsel erfolgen.

Material

Einfriermedium	RPMI-Medium 10% DMSO (v/v)
----------------	-------------------------------

2.3 Dehnungsexperimente

2.3.1 Die Vier-Punkt-Dehnungsmaschine

Die Vier-Punkt-Dehnungsmaschine eignet sich zur Applikation von uniformen Dehnungsreizen auf größere adhärente Zellkulturen in einer physiologischen Größenordnung. Hierzu wird eine flexible Kulturplatte über zwei innenliegende Auflagepunkte gebogen. Die Kulturplatte ändert hierbei ihre Form in eine Art Kreisbogen; die oben liegende Fläche wird elongiert. Die hierauf adhärenen Zellen werden gedehnt. Kontrollen mit Dehnungsmessstreifen bestätigen die unten aufgeführte geometrische Analyse. Diese Art der Zelldehnung eignet sich gut für Experimente, in denen größere Zellmengen für statistische Aussagen oder biochemische Analysen gebraucht werden.

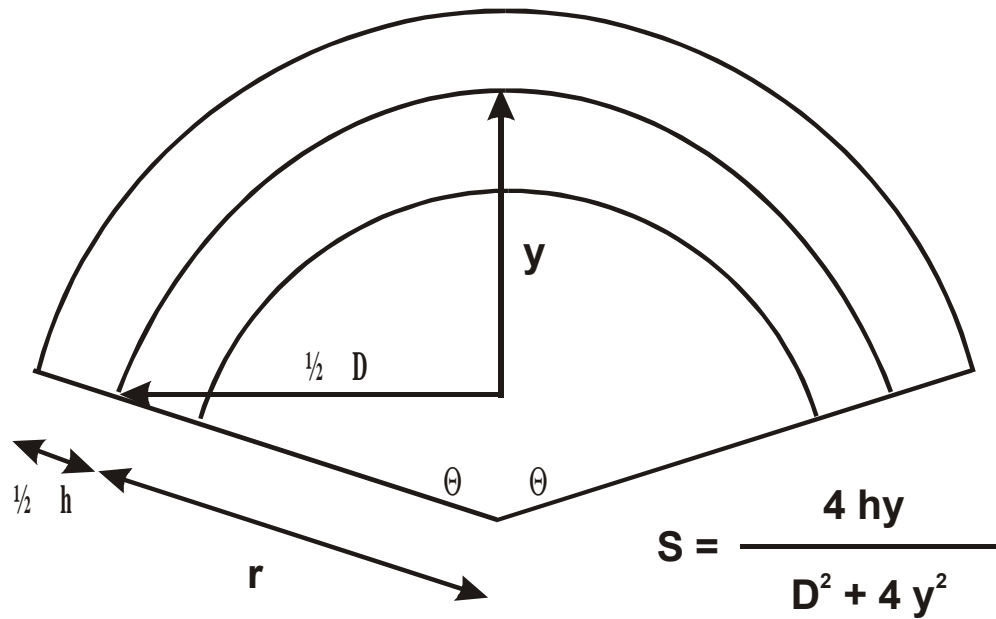


Abbildung 2.3.1-1: Geometrische Beschreibung der Biegung einer Kulturplatte

Die Biegung der Platte zwischen zwei Stützpunkten hat eine kreisförmige Verformung der Oberfläche zur Folge (Jones et al. 1993). h = Plattendicke, D = Abstand zwischen den Stützpunkten, y = Auslenkung, S = Strain, r = Radius.

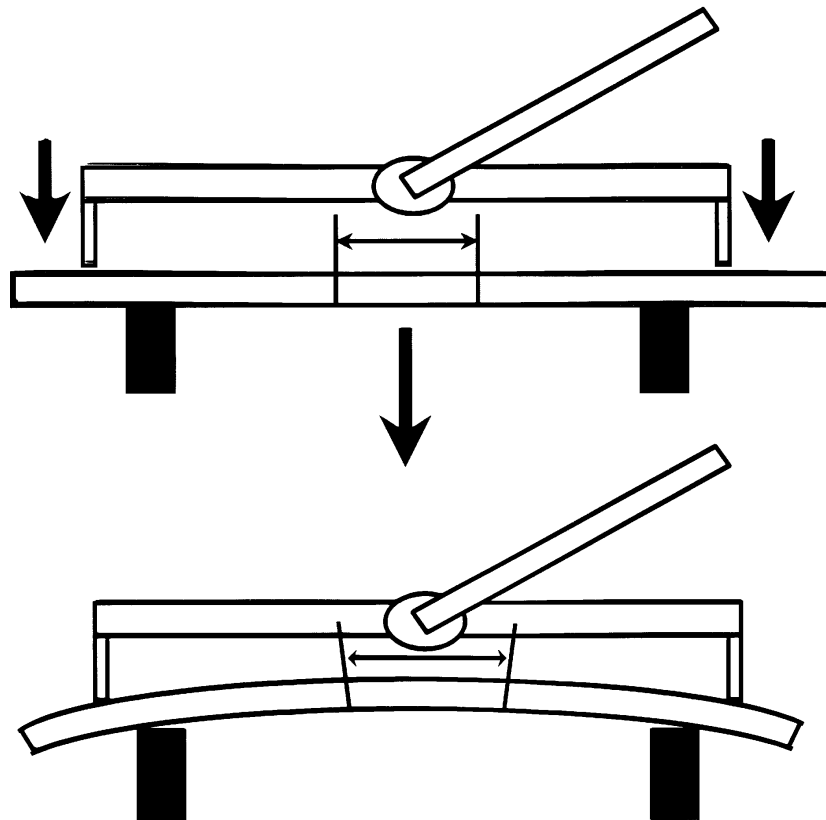


Abbildung 2.3.1-2: *Schematisierte Darstellung der 4-Punkt-Dehnungsmaschine*

Im Rahmen der Dehnungsexperimente werden am ersten Tag 60.000 Zellen/cm² auf eine Polykarbonat-9-Loch-Dehnungsplatte in Vollmedium ausgesät. Diese Platte wird dann an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit Hilfe der 4-Punkt-Dehnungsapparatur 30 mal mit 1Hz gedehnt. Die Deflektion der Platte wird hierbei so gesteuert, dass die Zellen eine Kraft von 4000 μ str erfahren. Am vierten Tag wird das MTT-Proliferationsassay durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgt mittels des Rangfolgentests nach Wilcoxon-Mann-Whithney.

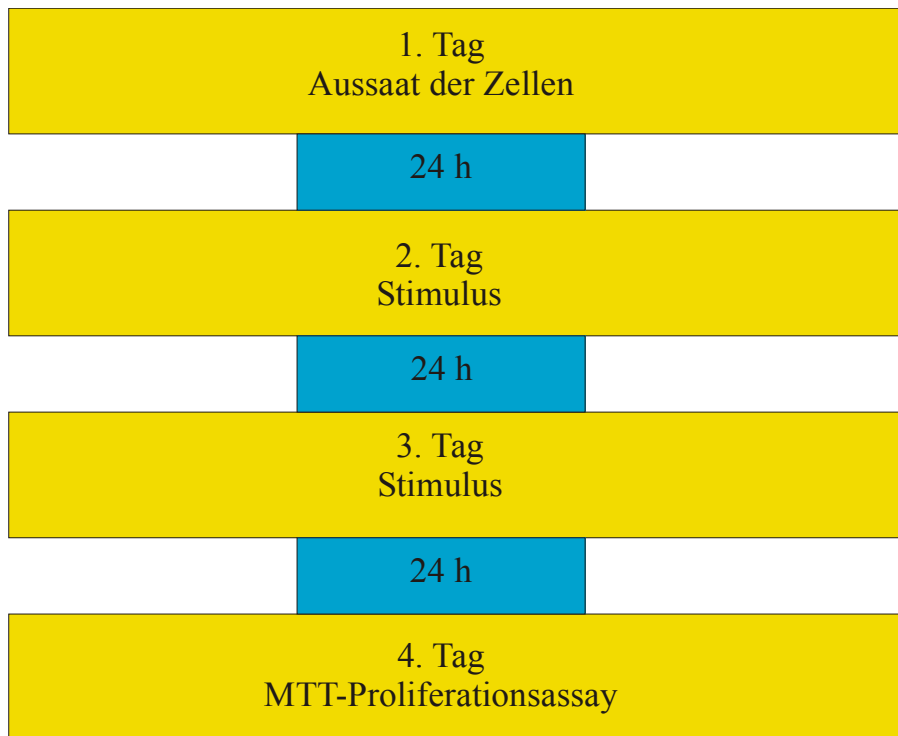


Abbildung 2.3-3: Die obige Abbildung zeigt ein Schema des Belastungszyklusses

2.4 MTT-Zellproliferationsassay

Mit Hilfe des von Mosmann beschriebenen spektrophotometrischen Zellproliferationsassays kann eine Bestimmung der Vitalität, Zytotoxizität und Proliferation von Zellen vorgenommen werden (Mosmann 1983). Hierbei wird das gelbe Tetrazoliumsalz MTT in das wasserunlösliche, dunkelblaue Formazan gespalten. Die Spaltung des Tetrazoliumringes findet nur in vitalen Zellen statt. In den Mitochondrien katalysiert die Succinat-Dehydrogenase (Slater et al. 1963) die oben beschriebene Reaktion. Die entstandenen Formazankristalle können dann in Isopropanol oder anderen organischen Lösungsmitteln gelöst werden. Die optische Dichte wird als Funktion der Konzentration an umgesetztem Farbstoff bestimmt, wobei sie mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen korreliert.

Zur Proliferationsbestimmung mechanisch stimulierter Osteoblasten werden 60.000 Zellen/cm² auf 9-Loch-Dehnungsplatten (0,5 cm²/well) ausgesät. Die

Zellen werden nach dem Anwachsen an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit einer Frequenz von 1Hz dreißigmal gedehnt. Nach jeder Dehnung erfolgt ein Mediumwechsel. Nach Abschluss der Dehnungsexperimente wird das Medium von den Zellen abgesaugt. Das Medium in den 9 Löchern wird gegen 100µl MTT-Lösung (Lösung 2) ausgetauscht. Nach 4 Stunden Inkubation bei 37°C wird die MTT-Lösung mit der gleichen Menge Lösungsmittel (Lösung 3) versetzt und für 5-15min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur photometrischen Auswertung wird die Lösung dann in eine Mikrotiterplatte überführt und hier die Extinktion bei 580nm ($Abs_{max}=570nm$) photometrisch bestimmt. Die statistische Auswertung der so erhaltenen Ergebnisse wurde mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, dem „Two-sample-Test“ vorgenommen (Wilcoxon 1945; Mann & Whitney 1947).

Material

MTT	(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid)	
Lösung 1	MTT-Stammlösung	5mg/ml in PBS
Lösung 2	MTT-Lösung	1:10 Verdünnung der MTT-Stammlösung in Nährmedium ohne Zusatz
Lösung 3	Lösungsmittel	20% SDS (w/v), 50% Dimethylformamid (v/v) in ddH ₂ O

2.5 Western-Transfer-Verfahren

2.5.1 Proteingewinnung

Zur Gewinnung der Proteine für das Western-Transfer Verfahren werden die für das Experiment benötigten Zellen in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 6cm mit einer Dichte von ca. 10000 Zellen/cm² ausgesät. Hierin werden die Zellen einen Tag kultiviert und anschließend der anstehende Versuch mit den Zellen begonnen.

Zur Gewinnung der Proteine werden die Kulturschalen zunächst zweimal mit 4°C kaltem PBS gespült, um die Stoffwechselaktivität der Zellen zu senken, Proteinasen zu inhibieren und somit einer Proteinverdauung nach dem Absterben der Zellen vorzubeugen. Auch alle nachfolgenden Schritte erfolgen auf Eis. Anschließend wird die Zelllage mit 1ml eiskaltem PBS/10⁶ Zellen mit Hilfe eines

Zellschabers von der Oberfläche der Kulturschale abgelöst und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Jetzt wird das Zell-PBS Gemisch bei 3000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert, um eine Sedimentation der Zellen zu erreichen. Der Überstand an PBS wird dann verworfen und das Zellpellet in eine adäquate Menge Proteinlyse-Lösung (50µl/10⁶ Zellen) überführt. Diese Mischung wird dann gut gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird erneut gemischt und die Reaktionsgefäße bei 13000 U/min erneut zentrifugiert. Der jetzt die Proteine enthaltende Überstand wird vorsichtig abpipettiert und kann jetzt bei –20°C einige Zeit konserviert werden.

Material

Lysepuffer	Tris/HCl, pH 7,5	20mM
	KCl	100mM
	EGTA	0,5mM
	Na-Vanadat	1mM
	Na-Molybdat	1mM
	Calyculin A	1µM
	EDTA	1mM
	DTT	1mM
	Triton X-100	0,3(v/v)

2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Mit der Methode von Marion Bradford existiert eine schnell durchzuführende, sensitive und wenig störanfällige Prozedur zur Bestimmung auch kleiner Proteinkonzentrationen mit Hilfe des Trimethylmethan-Farbstoffes Coomassie Brilliantblau G-250 (Bradford 1976). Dieses bindet an basische Reste von Aminosäuren und verändert dabei seine Farbe von rot nach blau. Hierbei verschiebt sich auch das Absorptionsmaximum von 465nm nach 595nm. Bei einer Wellenlänge von 595nm hat der Farbstoff-Protein-Komplex einen hohen Extinktionskoeffizienten, der zu einer sensitiven Messung der Proteinkonzentration führt.

Zum Erstellen einer Standarddeichkurve wird aus einer BSA-Stammlösung eine Verdünnungsreihe hergestellt. Diese enthält aufsteigende Konzentrationen von 1µg Protein bis 20µg. Aus den erhaltenen Extinktionen wird dann eine

Regressionsgerade berechnet. Aus den zu bestimmenden Proteinlysaten unbekannter Konzentration werden jeweils 1µl, 3µl und 5µl entnommen und der aus diesen Werten berechnete Mittelwert mit der Standarddeichkurve korreliert.

Material

Coomassie-Brilliant-Blue G 250		
BSA (Bovines Serum Albumin)	Stammlösung	10mg/ml

2.5.3 Diskontinuierliche Proteinelektrophorese

Proteine werden in einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese aufgetrennt. Gewöhnlich verwendet man zur Auftrennung der Proteine ein 7,5%iges Polyacrylamidgel. Die Elektrophorese beginnt mit dem Auftragen der Proteine in einem 3%igen Sammelgel in dem alle Proteingrößen zwischen 40kDa und 200kDa gesammelt werden.

Die für die Elektrophorese benötigten Glasscheiben werden zunächst mit Alkohol gründlich gereinigt. Anschließend werden die Glasscheiben aufeinander gelegt, wobei sie durch Abstandhalter in einer Entfernung von 1,5mm getrennt sind. Zur Abdichtung der Kammer können diese Abstandhalter mit Silikon benetzt werden. Jetzt werden die Glasscheiben vertikal in einer dafür vorgesehenen Gießapparatur positioniert und nach unten mit Hilfe einer Gummilippe abgedichtet. Nach Überprüfung der Dichtheit der Kammer kann nun das Trenngel gegossen werden. Dieses wird dann mit Wasser beschichtet um einen geradlinigen Startrand zu erhalten und die Polymerisation des Gels abgewartet (ca. 30min). Ist diese abgeschlossen wird das Gel mehrfach mit H₂O gewaschen. Nachfolgend wird auf das Trenngel das niedriger konzentrierte Sammelgel gegossen in welches der Kamm als Platzhalter zur Herstellung der Proteinauftragstaschen platziert wird. Nach Polymerisation des Sammelgels (ca. 60min) wird der Kamm entfernt und auch dieses Gel wird gewaschen und in die dafür vorgesehene Elektrodenkammer transferiert. Diese wird mit Elektrodenpuffer (Laufpuffer) gefüllt und die Elektrophorese wird nach Auftragen der Proben begonnen (s. u.).

Material

Trenngel	Acrylamid-Stammlösung	11,5 ml
----------	-----------------------	---------

	Trenngelpuffer Tris/HCl, 1M, pH 8,8	22,5ml
	ddH ₂ O	25ml
	SDS 10% (w/v)	600µl
	APS 10% (w/v)	600µl
	TEMED	40µl
Sammelgel	Acrylamid-Stammlösung	1,5ml
	Sammelgelpuffer	2,5ml
	Tris/HCl, 1M, pH 8,8	
	ddH ₂ O	15,7ml
	SDS 10% (w/v)	200µl
	APS 10% (w/v)	200µl
	TEMED	30µl
Elektrodenpuffer	Tris	2,5mM
	Glycin	19,2mM
	SDS	0,1% (w/v)

2.5.4 Proteinauftrennung im Gel und Proteintransfer

Die Größentrennung der Proteine findet in einem 7,5%igen Polyacrylamidgel statt. Hierbei werden die Proben (30µg-100µg) mit SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:1 verdünnt und in die Taschen des Sammelgels aufgetragen nachdem sie für 5min bei 80°C denaturiert wurden. Die diskontinuierliche Elektrophorese wird mit 20V/cm bei maximal 30mA begonnen, bis sich eine einheitliche Lauffront der Proteins im Gel abzeichnet. Dann kann die Spannung auf bis zu 100V/cm erhöht werden. Wenn die Farbfront das untere Ende des Gels fast erreicht hat wird die Elektrophorese beendet.

Jetzt erfolgt der eigentliche Western-Transfer, dessen Name auf folgender Geschichte beruht: Der DNA Transfer wurde nach seinem Erstbeschreiber E. Southern als Southern-Blot benannt (Southern 1975). Die später aufgetauchten Verfahren des RNA-Transfers und eben auch das des Protein-Transfers wurden dann nach weiteren Himmelsrichtungen benannt. Zum vertikalen Transfer der Proteine auf eine Polyvinyliden-Difluoridmembran wird das Gel mit den aufgetrennten Proteinen auf einer ebensolche Membran platziert. Dieses geschieht

im Transferpuffer. Das Gel-Membran-„Sandwich“ wird dann in die Mitte von sechs Lagen in Transferpuffer getränkten Filterpapiers gelegt. Jetzt wird die Blottingapparatur geschlossen und die Proteine mit dem Stromfluss, der in Richtung Membran gerichtet ist auf diese transferiert. Zum 75 Minuten dauernden Transfer wird eine Spannung von 20V benötigt. Der Stromfluss wird auf 250mA begrenzt.

Material

SDS-Farbstoff	Tris/HCl, pH 7,5	125mM
	SDS	2% (w/v)
	Glycerin	10% (w/v)
	DDT	20mM
	EDTA	1mM
	Bromphenolblau	0,01% (w/v)
Transferpuffer	Glycin	192mM
	Tris	50mM
	Methanol	20% (v/v)

2.5.5 Ponceau-S-Färbung

Im Anschluss an den Proteintransfer auf die PVDF-Membran wird diese einer reversiblen Ponceau-S-Färbung unterzogen. Diese dient sowohl der Darstellung der transferierten Längenmarker zur späteren Größenbestimmung als auch dem Nachweis des korrekten Proteinauftrags. Hierbei sollte in allen Proteinlaufspuren die selbe Menge gefärbten Proteins zu sehen sein. Bei der Ponceau-S-Färbung werden alle transferierten Proteine unspezifisch angefärbt. Ihr Vorteil liegt in der Reversibilität.

Zum Anfärben der Membran wird diese für 40 Sekunden in Ponceau-S gefärbt und anschließend die überschüssige Farbe mit Entfärbelösung von der Membran entfernt. Die Inkubation in der Entfärbelösung sollte abgebrochen werden, sobald die Proteinbanden eindeutig zu erkennen sind. Anschließend wird das Bild der gefärbten Membran mit einem Computerscanner festgehalten um den Proteinauftrag zu dokumentieren.

Material

10fach Ponceau-S-	3-Hydroxy-4-[2-sulfo-4-	
-------------------	-------------------------	--

Lösung	sulfo-phenylazo]-2,7-naphthalondisulfonsäure	2% (w/v)
	Trichloressigsäure	30% (v/v)
	Sulfosalicylsäure	30% (w/v)
Entfärbelösung	Methanol	50% (v/v)
	Essigsäure	1% (v/v)

2.5.6 Immunologische Proteindetektion

Nach der unspezifischen Proteinfärbung blockiert man die Membran über Nacht in TBST-Puffer, dem 5% Rinderserumalbumin zugesetzt wird (Blockierungslösung). Nach dem Blockierungsschritt wird die Membran 10 Minuten in TBS gewaschen. Anschließend gibt man den Primärantikörper (gegen das nachzuweisende Protein gerichtet) in 20ml Blockierungslösung und inkubiert für 2 Stunden auf einem Rüttler. Danach wird die Membran 3 mal für 10 Minuten in TBST gewaschen. Im Anschluss hieran wird der Sekundärantikörper (Anti-Hase IgG, alkalische Phosphatase markiert) in 20ml TBST auf die Membran gegeben. Dieser ist gegen die Fc-Region des Primärantikörpers gerichtet und mit alkalischer Phosphatase markiert. Auch dieser Antikörper wird für 2 Stunden auf der Membran inkubiert. Die Membran wird danach erneut dreimal für 10 Minuten mit TBST gewaschen. Zur Vorbereitung auf den colorimetrischen Nachweis wird die Membran dann noch einmal mit TBS für 5 Minuten gespült.

Der Nachweis erfolgt mit 330µg/ml NBT und 330µg/ml BCIP in AP-Puffer.

Als Alternative zu dieser Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Proteindetektion der Chemilumineszent-Kit der Firma ICN benutzt. Hier ist ein lumineszierender Stoff an die Fc-Region des Sekundärantikörpers gebunden. Nach einer experimentell zu bestimmenden Inkubationszeit von im Mittel 8 Minuten können die an die Proteine gebundenen Antikörper auf konventionellem Röntgenfilm detektiert werden.

Material

TBS-Puffer	Tris/HCl	
TBST-Puffer	TBS	99,9% (v/v)
	Tween 20	0,1% (v/v)
Blockierungslösung	TBST	95% (v/v)

	BSA (Rinderserunalbumin)	5% (w/v)
Alkalische Phosphatase Reaktionspuffer (AP- Puffer)	NaCl MgCl ₂ Tris, pH 9,5	100mM 5mM 100mM
NBT-Stammlösung	Nitroblautetrazoliumbro- mid Dimethylformamid	50mg/ml 70% (v/v)
BCIP-Stammlösung	5-Bromo-4-chloro-3- indolylphosphat Dimethylformamid	50mg/ml 100% (v/v)
Phospholipase C- Antikörper (monoklonale Primärantikörper, Firma Santa Cruz)	β1-Antikörper β2-Antikörper β3-Antikörper	0,1µg/ml 1µg/ml 1µg/ml
Anti-Hase IgG mit alkalischer Phosphatase markiert, Firma Sigma	Anti-Rabbit IgG	Verdünnung 1:3000

2.6 Molekularbiologie

2.6.1 Transfektion und Selektion

Zum Übertragen der Antisense-Vektoren in Osteosarkomzellen wurde der Transfektionskit SuperFect der Firma Qiagen verwendet. Es wurde das Protokoll für die stabile Transfektion von adhärenenten Zellen benutzt. Das in dem Reagenz enthaltene Dendrimer (Tang et al. 1996) bildet eine sphärische Architektur um die DNA. Diese ermöglicht dann eine einfache Permeation in die Zelle. Bei der darauf folgenden Verschmelzung des Endosoms mit dem Lysosom puffert das Reagenz den pH-Wert des Lysosoms und inaktiviert somit dessen Endonukleasen. Hiernach gelangt ein Teil der Plasmide in den Zellkern und wird hier in die chromosomale DNA eingebaut. Durch den Einsatz linearisierte DNA kann man diese Einbauwahrscheinlichkeit noch erhöhen.

Am Tag vor der stabilen Transfektion setzt man Zellen einer Kultur so aus, dass am nächsten Tag eine Konfluenz von 70-80% erreicht wird. Hierbei werden 350.000 Zellen in 26,5cm² große Kulturschalen gesät. Nun werden 5µg endotoxinfreier Plasmid-DNA (gelöst in TE, pH 7,4) mit 150µl Serum verdünnt. Das Serum darf zu diesem Zeitpunkt weder Antibiotika, Serum oder Proteine enthalten; diese würden die Komplexformierung stören. Dieser Ansatz wird mit 20µl SuperFect-Reagenz versetzt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wird hierzu 1ml Wachstumsmedium gegeben, welches jetzt die Zusätze Antibiotikum, Serum und Proteine enthalten darf. Dieser Ansatz wird gut gemischt und auf die mit PBS gewaschene Zellkultur gegeben. Die Kulturschalen mit den Zellen und dem Transfektionsreagenz werden dann für drei bis vier Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen vier mal mit PBS gespült und mit Standardmedium versehen. Jetzt werden die Zellen für 48 Stunden kultiviert und anschließend je nach Zelldichte passagiert. Nach der Passage werden die Zellen mit Selektivmedium ausgesät. Dieses Medium enthält zur Selektion das Antibiotikum Zeocin. In der mit diesem Medium angesetzten Zellkultur überleben nur Zellen, die das Plasmid pIND(SP1) aufgenommen haben. Auf diesem Plasmid liegt eine spezifische Resistenz gegen Zeocin. Im Rahmen

dieser Arbeit wurde der Wildtyp U-2/OS stabil mit den Vektoren für die Antisense Sequenzen PLC β 1, PLC β 2 und PLC β 3 transfeziert. Außerdem wurden stabile Zelllinien des Wildtyps MG-63 mit den pIND(SP1) Vektoren transfeziert, die die Antisense Sequenzen PLC β 1 und PLC β 2 tragen.

Die Erfolgskontrollen sowie die Negativkontrollen erfolgten mittels RT-PCR. Eine erfolgreiche Transfektion konnte für alle hier etablierten Antisense-Zelllinien nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung, Dr. med. M. Hoberg, Labor für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik).

Material

Transfektion	SuperFect Reagenz Medium ohne Zusätze
Selektion	Medium mit Zeocin (400 μ g/ml)

2.7 Arbeiten mit Bakterienkulturen

2.7.1 Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung von kompetenten E. coli DH5 erfolgt nach einer vielfach modifizierten Methode, die auch von Chung beschrieben wurde (Chung 1989). Aus einer 5ml Übernachtskultur wird 1ml entnommen, in 400ml LB-Medium überimpft und auf einem Flaschenrüttler bei 37°C / 300rpm für vier Stunden inkubiert. Während der Inkubation wird alle 30 Minuten die OD_{595nm} gemessen. Wenn diese einen Wert von 0,6 erreicht hat, kann mit den folgenden Schritten begonnen werden. Alle folgenden Schritte finden auf Eis statt. Die Kultur wird in 50ml Polypropylen-Reaktionsgefäße überführt und auf 0°C abgekühlt. Dann zentrifugiert man die Gefäße für 10 Minuten bei 3000g. Der Überstand wird abgenommen, und das Pellet anschließend in 10ml CaCl₂-Lösung resuspendiert. Dieser Schritt wird wiederholt. Jetzt wird das Pellet in 10ml CaCl₂ aufgenommen und kann für die Transformation verwendet werden. Das Maximum der Kompetenz wird allerdings erst nach 12-24 Stunden erreicht. Nachdem man die Bakterien mit flüssigem Stickstoff schockgefroren hat können sie bei -80°C gelagert werden, da die hier verwendete CaCl₂-Lösung bereits 15% Glycerin enthält.

Material

CaCl ₂ -Lösung	CaCl ₂	60mM
	Glycerin	15% (v/v)
	PIPES, pH 7	10mM

2.7.2 Transformation

Zur Aufnahme des Vektors in die kompetenten Bakterien mischt man 100µl der kompetenten Bakterien mit 1ng des Plasmids und inkubiert dieses Gemisch für 30 Minuten auf Eis. Anschließend werden die Bakterien für zwei Minuten einem Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad ausgesetzt. Dann werden die Bakterien wieder auf 0°C herabgekühlt. Jetzt gibt man 1ml LB-Medium hinzu und inkubiert für 60 Minuten bei 37°C. In dieser Zeit kann das Bakterium die Antibiotikaresistenz exprimieren, die auf dem Plasmid liegt. Jetzt können die 200µl der Bakterienlösung (90mm-Platte) auf Selektivmedium (LB-Agar mit 50µg/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht inkubiert werden.

2.7.3 Lagerung von E. coli

Sollen kompetente Bakterien gelagert werden, kann dies im Nährmedium mit einem 15%igen Glycerinanteil geschehen. Hierzu versetzt man 850µl einer Bakterienübernachtskultur mit 150µl sterilem Glycerin und gibt das Gemisch in ein Kryoröhrchen. Bei -80°C können die Bakterien so einige Jahre gelagert werden.

2.8 Genexpression mit Hilfe des Ecdyson-Systems

Das Ecdyson-System für die induzierbare Genexpression basiert auf der Fähigkeit des Insektenhormons 20-Hydroxyecdysen die Genexpression über einen Rezeptor zu aktivieren. Hierzu wird ein Heterodimer des Ecdysonrezeptors (VgEcR, aus *Drosophila melanogaster*) und der Retinoid-X-Rezeptor (RXR, aus Säugetierzellen) benutzt. Diese binden unter Zugabe von Ecdyson oder einem synthetischen Analogon (Ponasterone A) an ein Ecdyson-Antwortelement (E/GRE), welches dann die Transskription initiiert.

2.8.1 Ponasterone A

Ponasterone ist ein mehrfach hydroxyliertes Steroidhormon. Es ruft bei Insekten die Wirkung eines starken Häutungshormones hervor. Es wird zur Genexpression durch einen Ecdyson-induzierbaren Promoter nach No et al. genutzt (No et al. 1996). Ponasterone A wurde zuerst aus *Podocarpus nakaii* isoliert (Nakanishi et al. 1966). Es konnte gezeigt werden, dass es die Häutung von Hausfliegen und Würmern induziert (Kobayashi et al. 1967). Man nutzt es zur Charakterisierung von Ecdysonerezeptoren in Fruchtfliegen (Maroy et al. 1987; Sage et al. 1982). Auf Säugetiere hat Ponasterone keinen pharmakologischen Effekt (Masuoka et al. 1970).

2.8.2 Aktivierung der Genexpression durch Ponasterone A

Ponasterone wird in einer experimentell ermittelten optimalen Konzentration zu einem Vollmedium gegeben (5µm). Das Medium kann nun wie gewohnt verwendet werden. Es wird auf Zellen gegeben, die zuvor mit den Vektoren pIND(SP1) und pVgRXR kotransfeziert worden sind. Der pIND Vektor enthält die genetische Information zur Translation der Antisense-mRNA, sowie einen weiteren Promotor, der durch den endogenen Transkriptionsfaktor sP1 ständig basal aktiviert wird. Der pVgRXR Vektor enthält den oben beschriebenen Komplex der Rezeptoren für das Häutungshormon. Wird nun das Ponasterone enthaltende Medium auf diese Zellen gegeben lagern sich RXR und VgEcR zusammen und binden an das Hybrid-Antwort-Element im in das Genom eingebauten pIND-Vektor. So wird die Transskription des gewünschten DNA-Abschnittes aktiviert.

Material

Ponasterone A	
Vollmedium	
Vektoren	pIND(SP1) pVgRXR

3 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Identifizierung der am schnellen Prozess der Mechanotransduktion beteiligten Isoform der phosphoinositolspezifischen Phospholipase C. Hierzu wurden zunächst vergleichende Untersuchungen zur Mechanosensibilität von U-2/OS und MG/63 Osteosarkomzellen vorgenommen. Dies diente der Einteilung der Sarkomzelllinien in mechanosensitive und nicht-mechanosensitive Zelllinien. Anschließend wurde in zwei verschiedenen Zelllinien (U-2/OS: nicht mechanosensibel; MG/63: mechanosensibel) ein induzierbares System zur Erzeugung von Antisense-mRNA gegen Phospholipase C mRNA etabliert. Aufbauend hierauf erfolgten Dehnungsexperimente mit diesen Antisensezellen, um deren Reaktion auf physiologische Dehnungsreize zu untersuchen.

3.1 Dehnungsexperimente mit U-2/OS und MG-63 Wildtyp-Zellen

3.1.1 Proliferationsassay U-2/OS

U2OS	gedehnt	ungedehnt	gedehnt	ungedehnt	gedehnt	ungedehnt
	0,542	0,521	0,496	0,612	0,465	0,318
	0,680	0,610	0,339	0,432	0,308	0,341
	0,588	0,560	0,599	0,556	0,353	0,416
	0,533	0,544	0,521	0,593	0,415	0,352
	0,800	0,605	0,519	0,586	0,364	0,378
	0,785	0,653	0,530	0,611	0,374	0,441
	0,956	0,754	0,517	0,528	0,361	0,437
	0,686	0,556	0,571	0,594	0,395	0,341
Mittelwert	0,6962	0,6003	0,5115	0,564	0,3793	0,378
Standardabweichung	14,57%	7,52%	7,72%	6,04%	4,67%	4,77%
Differenz	15,97%		-9,31%		0,36%	
Testgröße	44		15		34	
$T=UX^1$						
UY	20		49		29	
Signifikanz	Nicht signifikant		Nicht Signifikant		Nicht signifikant	

¹= unterer kritischer Wert = 13; oberer kritischer Wert = 51

Die oben aufgeführten Ergebnisse der hier getesteten Zellen der humanen Osteosarkomzelllinie U-2/OS zeigen eine Auswahl der durchgeführten Dehnungsexperimente.

Das MTT-Proliferationsassay zeigt in keinem Experiment eine signifikante Steigerung der Proliferationsrate und der Stoffwechselaktivität.

3.1.2 Proliferationsassay MG-63

MG-63	gedehnt	ungedehnt	gedehnt	ungedehnt	gedehnt	ungedehnt
	1,193	0,935	1,193	0,935	0,555	0,528
	1,129	0,635	1,129	0,635	0,520	0,441
	1,264	0,999	1,264	0,980	0,546	0,555
	0,998	0,868	0,961	0,868	0,598	0,416
	1,020	0,933	0,857	0,933	0,719	0,488
	0,923	0,857	1,020	0,857	0,710	0,521
	1,220	0,912	0,923	0,948	0,581	0,563
	0,959	0,849	0,963	0,849	0,606	0,441
Mittelwert	1,08825	0,8735	1,03875	0,875625	0,604375	0,494125
Standard- abweichung	11,92%	12,42%	13,67%	12,36%	12,17%	11,37%
Differenz	24,59%		18,63%		22,31%	
Testgröße T=UX ¹	59		52		56	
UY	5		11		6	
Signifikanz	Signifikant		Signifikant		Signifikant	

¹Unterer kritischer Wert = 13; oberer kritischer Wert = 51; $\alpha = 0,05$

Die hier getesteten Zellen der humanen Osteosarkomzelllinie MG-63 zeigen in den durchgeführten Dehnungsexperimenten mit anschließendem MTT-Proliferationsassay eine signifikante Steigerung der Proliferationsrate und der Stoffwechselaktivität.

Das statistische Mittel aller durchgeführten Dehnungsexperimente liegt bei einer Steigerung der Stoffwechselaktivität von 22%.

Die durchgeführten Dehnungsexperimente mit den Wildtyp Zelllinien zeigten, dass der Wildtyp U-2/OS nicht mit einer Proliferationssteigerung auf Dehnungsreize reagiert. Im Gegensatz hierzu zeigt die Osteosarkomzelllinie MG-63 eine Steigerung der Proliferationsrate als Antwort auf die Dehnungsreize. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden diese zwei Zelllinien zu vergleichenden weiteren Versuchen benutzt. Hierfür wurden die U-2/OS Zellen mit dem pIND(SP1) Vektor transfeziert, der jeweils die Antisense Sequenz gegen die PLC $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 3$ trug. In MG-63 Zellen gelang die Transfektion mit Antisense Sequenzen tragenden Vektoren gegen die PLC $\beta 1$ und PLC $\beta 2$.

3.2 Western-Analyse der verschiedenen Zelllinien

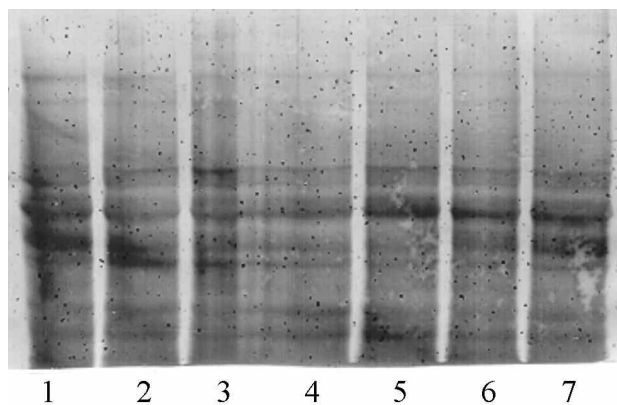
Die Zellkulturen mit den verschiedenen untersuchten Osteosarkomzelllinien wurden in 6 cm Kulturschalen kultiviert, bis eine Konfluenz von 70% - 80% erreicht wurde. Dann wurde die für das Experiment vorgesehene Menge Ponasterone A hinzugegeben; hierdurch wurde die Transkription der Antisense mRNA gestartet. Die Zellen wurden nach 6 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden mit einem Protein-Lysepuffer lysiert (siehe 2.5.1). Bei Dosis-Wirkungsexperimenten wurden alle inkubierten Kulturschalen nach 24 Stunden lysiert. Weiterhin wurde eine Antisense Zelllinie ohne Stimulation lysiert, und es wurde eine Wildtyp-Zelllinie lysiert. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe des Assay nach M. Bradford wurden 50µg Protein je Tasche auf ein diskontinuierliches Polyacrylamidgel aufgetragen. Die nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine wurden dann auf eine PVDF-Membran geblottet. Dort wurde die Phospholipase C immunochemisch nachgewiesen. Die Bestimmung der Proteinmenge wurde mit Hilfe der Gelauswertungssoftware ScionImage durchgeführt.

3.2.1 Dosis-Wirkungs-Beziehung in MG-63 β 2 Antisense Zellen

Die vom Hersteller vorgeschlagene Konzenration von Ponasterone im Medium zur optimalen Vektorinduktion lag bei 10µM. Diese Vorgabe wurde an der zuerst etablierten Antisense-Zelllinie MG-63 β 2 AS getestet.

	MG-63	MG-63 β 2 AS
--	-------	--------------------

Lyse aller angesetzten Zellkulturen nach 24h	MG-63 Wildtyp	MG-63 $\beta 2$ AS ohne Ponasterone
		MG-63 $\beta 2$ AS, 2,5 μ M Ponasterone
		MG-63 $\beta 2$ AS, 5 μ M Ponasterone
		MG-63 $\beta 2$ AS, 10 μ M Ponasterone
		MG-63 $\beta 2$ AS, 25 μ M Ponasterone
		MG-63 $\beta 2$ AS, 40 μ M Ponasterone



1 = MG-63 Wildtyp
 2 = unstimulierte MG-63 $\beta 2$ AS
 3 – 7 = stimulierte MG-63 $\beta 2$ AS

Abbildung 3.2.1-1: Unspezifische Ponceau-S Färbung nach Western-Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran.

Die Färbung dient der Dokumentation eines gleichmäßigen Auftrages von 50 μ g Protein auf allen Bahnen.

Die erwartete Größe der Phospholipase C $\beta 2$ in der Western-Analyse liegt bei einer Kettenlänge von 1181 Aminosäuren bei einem Molekulargewicht von 163 kDa. Das gefundene Signal liegt bei allen durchgeführten Experimenten (n=2) bei 55 kDa. In der Literatur existieren keine Angaben zu dieser Diskrepanz. Die vorwiegend zytosolischen Isoenzyme der PLC können in den erwarteten Größen nachgewiesen werden.

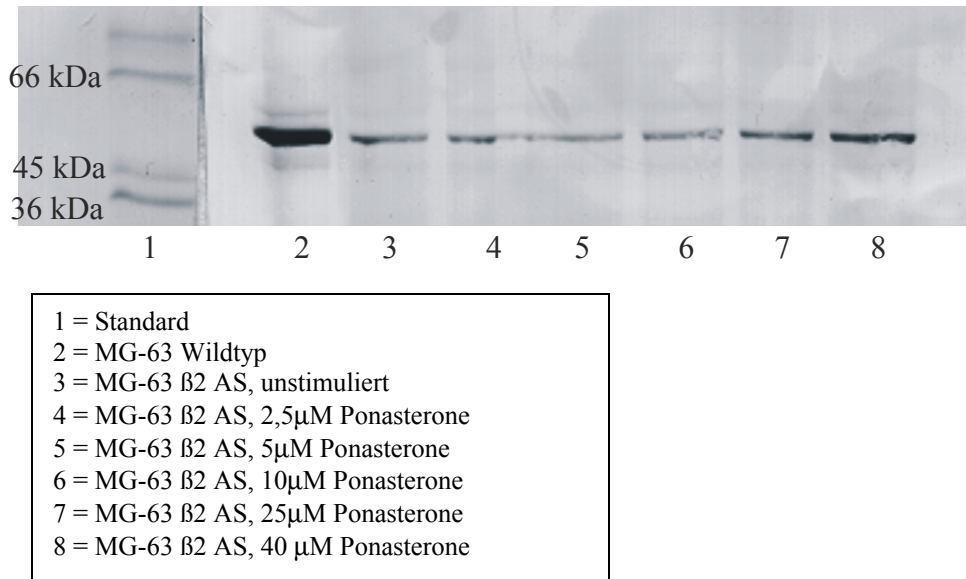


Abbildung 3.2.1-2.: Western Analyse der Phospholipase C $\beta 2$ in der Osteosarkomzelllinie MG-63 und in MG-63 $\beta 2$ -Antisense Zellen.

Die immunologische Detektion fand mit polyklonalen Phospholipase C $\beta 2$ Antikörpern statt. Die anschließende Färbung wurde mit NBT / BCIP durchgeführt.

In den MG-63 $\beta 2$ Antisense Zellen lässt sich eine Suppression der Phospholipase C $\beta 2$ in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge an Ponasterone zeigen. Die stärkste Suppression findet sich bei einer Ponasterone Konzentration im Nährmedium von 10 μ M (6).

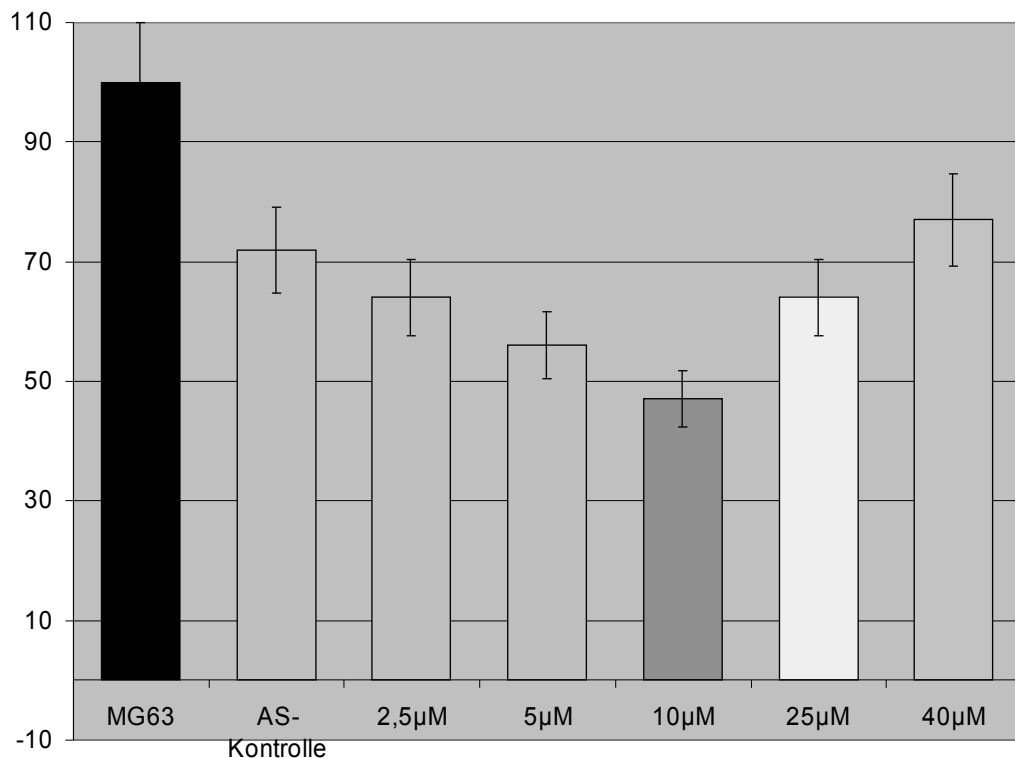


Abbildung 3.2.1-3: Balkenhistogramm der Dosis-Wirkungsbeziehung in MG-63 β 2 Antisense Zellen.

Die obige Abbildung zeigt die histografische Verdeutlichung der in n=2 Experimenten gewonnenen Ergebnisse der Suppression der Phospholipase C β 2 in MG-63 Osteosarkomzellen in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge Ponasterone. Hierbei wurde die vorhandene Menge Phospholipase C β 2 in MG-63 Zellen zugrunde gelegt.

Insgesamt konnte die stärkste Unterdrückung dieses Isoenzymes in den Antisense Zelllinien durch eine 10 μ M Konzentration des Steroidhormones im benutzten Medium erreicht werden. Es werden relative Werte dargestellt, die mit Hilfe der Western Blot Bildauswertungssoftware Scion Image der Firma Scion Corporation ermittelt wurden.

3.2.2 Western Analyse der Antisense Zelllinien

3.2.2.1 Die PLC $\beta 1$ in U-2/OS- und in U-2/OS $\beta 1$ Antisense Zellen

	U-2/OS	U-2/OS $\beta 1$ AS
Lysezeitpunkt der Zellkulturen (Splitting = Zeitpunkt 0h)	24 h	6 h nach Ponasteronezugabe
		24 h nach Ponasteronezugabe
		48 h nach Ponasteronezugabe
		ohne Ponasterone Zugabe

Die Ponasteronekonzentration im Medium betrug $10\mu\text{M}$. Die erwartete Größe der Phospholipase C $\beta 1$ liegt bei einer Länge von 1216 Aminosäuren bei einem Molekulargewicht von 150 kDa. Die gefundene Größe liegt in allen Experimenten bei 60 kDa. In der Literatur existieren keine Angaben zu dieser Diskrepanz. In U-2/OS Zellen kann ein zweites Fragment der PLC $\beta 1$ mit den polyklonalen Antikörpern nachgewiesen werden (LeMellay et al. 1997).

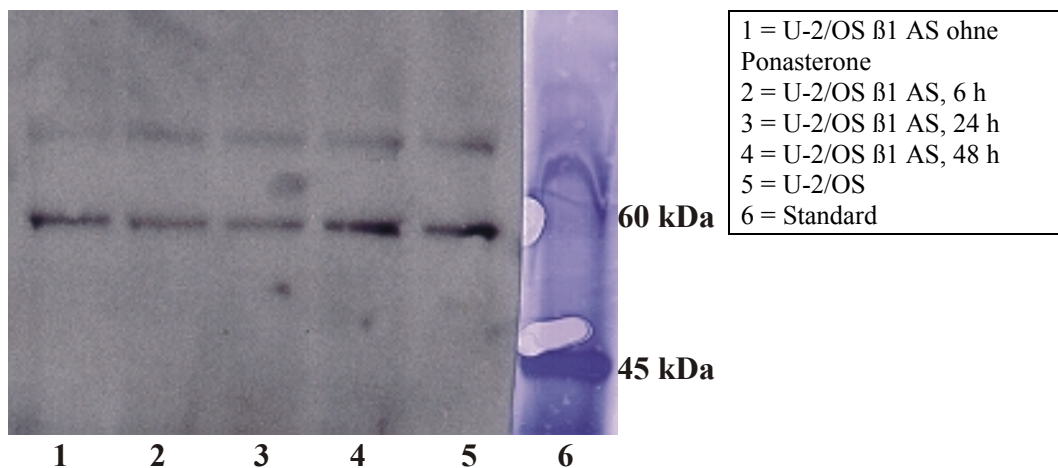


Abbildung 3.2.2.1-2: Western Analyse der Phospholipase C $\beta 1$ in der Osteosarkomzelllinie U-2/OS und in U-2/OS $\beta 1$ -Antisense Zellen.

Die immunologische Detektion fand mit polyklonalen Phospholipase C β 1 Antikörpern statt. Die anschließende Färbung wurde mit BCIP / NBT durchgeführt.

Nach 6 und 24 Stunden ist eine Intensitätsminderung der PLC β 1-Bande zu erkennen. Die nachweisbare Enzymmenge war nach 24h im Mittel um 32% supprimiert. Eine maximale Suppression der PLC β 1 kann nach 24h gefunden werden. Nach 48h zeigt sich ein Rebound mit Steigerung der Menge PLC β 1 um 20%.

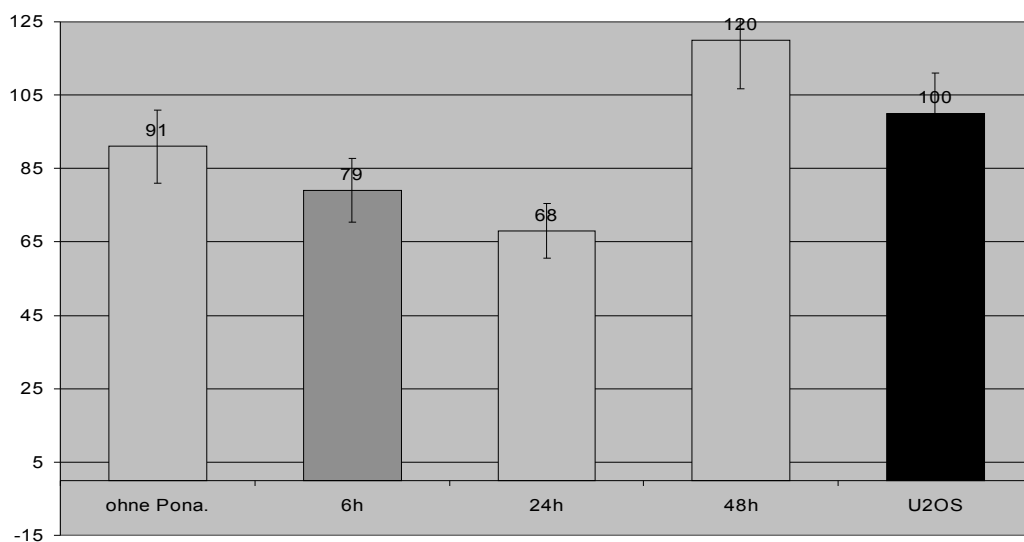


Abbildung 3.2.2.1-3: Balkenhistogramm der relativen Mengen Phospholipase C β 1.

Zusammengefasst dargestellt wird hier die im Western-Blot Verfahren gefundene Menge der Phospholipase C beta1 in der U-2/OS Zelllinie, die hier als Referenzwert dient und in den Antisense Zelllinien die eine hiervon abweichende Menge Phospholipase C β 1 nach verschiedenen Inkubationszeiten mit Ponasterone A zeigen. Die Angaben zeigen einen Durchschnitt aus n = 3 Western-Blots. Es werden relative Werte dargestellt, die mit Hilfe einer Blotauswertungssoftware (Scion Image) gewonnen wurden.

3.2.2.2 Die PLC $\beta 2$ in U-2/OS- und in U-2/OS $\beta 2$ Antisense Zellen

	U-2/OS	U-2/OS $\beta 2$ AS
Lysezeitpunkt der Zellkulturen (Splitting = Zeitpunkt 0h)	24 h	6 h nach Ponasteronezugabe
		24 h nach Ponasteronezugabe
		48 h nach Ponasteronezugabe
		ohne Ponasterone Zugabe

Die Ponasteronekonzentration im Medium betrug $10\mu\text{M}$. Die erwartete Größe der Phospholipase C $\beta 2$ in der Western-Analyse liegt bei einer Kettenlänge von 1181 Aminosäuren bei einem Molekulargewicht von 163 kDa. Die Ergebnisse für die PLC $\beta 2$ in U-2/OS Osteosarkomzellen sind sehr heterogen. Der Nachweis mit polyklonalen Antikörpern war in U-2/OS Osteosarkomzellen nicht eindeutig durchführbar.

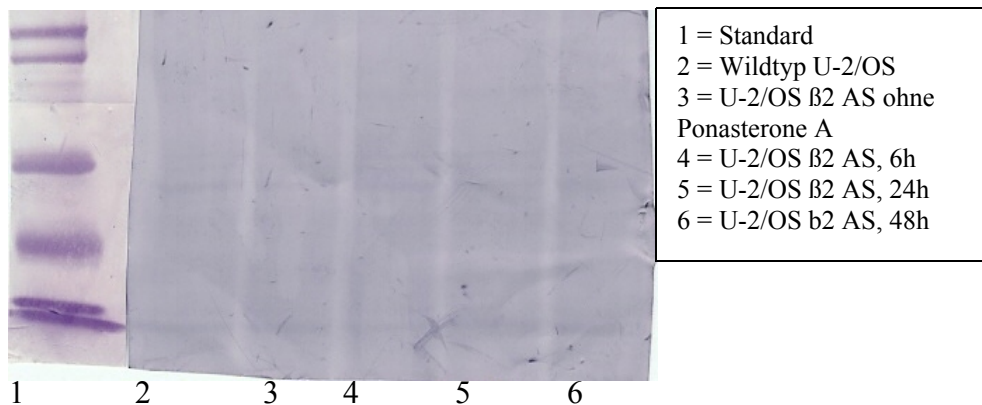


Abbildung 3.2.2.2-1: Western-Analyse der Phospholipase C $\beta 2$ in der Osteosarkomzelllinie U-2/OS und in U-2/OS $\beta 2$ -Antisense Zellen.

Die immunologische Detektion fand mit polyklonalen Phospholipase C $\beta 2$ Antikörpern statt. Die anschließende Färbung wurde mit BCIP / NBT durchgeführt.

Eine eindeutige Aussage zur Phospholipase C $\beta 2$ in U-2/OS Antisensezellen kann Anhand der durchgeführten Experimente nicht getroffen werden. Es zeigte sich in mehreren Western-Analysen der PLC $\beta 2$ in U-2/OS kein eindeutiges Signal.

3.2.2.3 Die PLC $\beta 3$ in U-2/OS und in U-2/OS $\beta 3$ Antisense Zellen

	U-2/OS	U-2/OS $\beta 3$ AS
Lysezeitpunkt der Zellkulturen Splitting = Zeitpunkt 0h:	24 h	6 h nach Ponasteronezugabe
		24 h nach Ponasteronezugabe
		48 h nach Ponasteronezugabe
		ohne Ponasterone Zugabe

Die Ponasteronekonzentration im Medium betrug 10 μ M. Die Phospholipase C $\beta 3$ hat eine Länge von 1234 Aminosäuren. Das Molekulargewicht des Enzyms liegt bei 153 kDa. Das gefundene Signal im Western-Blot liegt bei 70 kDa. Zu dieser Diskrepanz existieren keine Angaben in der Literatur.

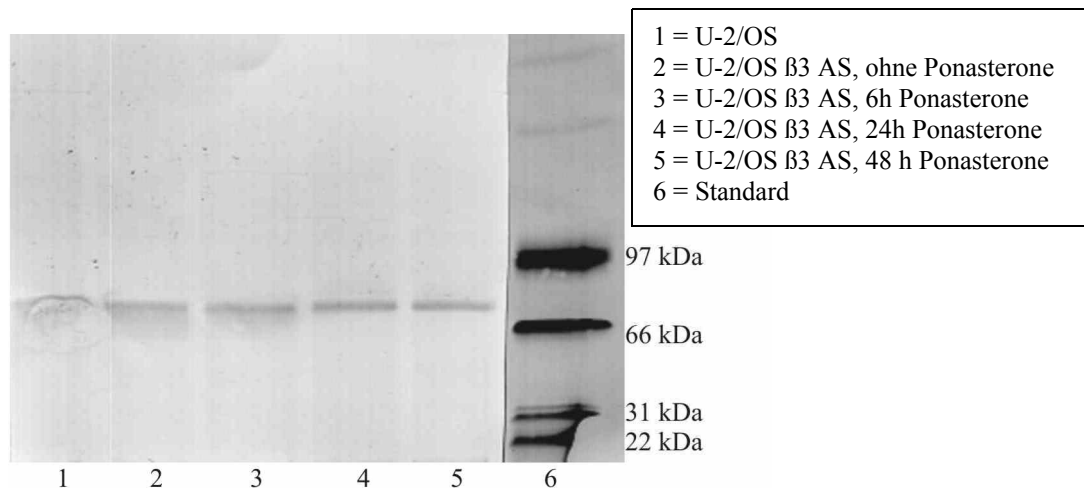


Abbildung 3.2.2.3-2: Western-Analyse der Phospholipase C $\beta 3$ in der Osteosarkomzelllinie U-2/OS und in U-2/OS $\beta 3$ -Antisense Zellen.

Die immunologische Detektion fand mit polyklonalen Phospholipase C $\beta 3$ Antikörpern statt. Die anschließende Färbung wurde mit BCIP / NBT

durchgeführt. Im Verlauf fand sich in drei Experimenten eine Suppression der PLC $\beta 3$ um maximal 26% nach 48 Stunden.

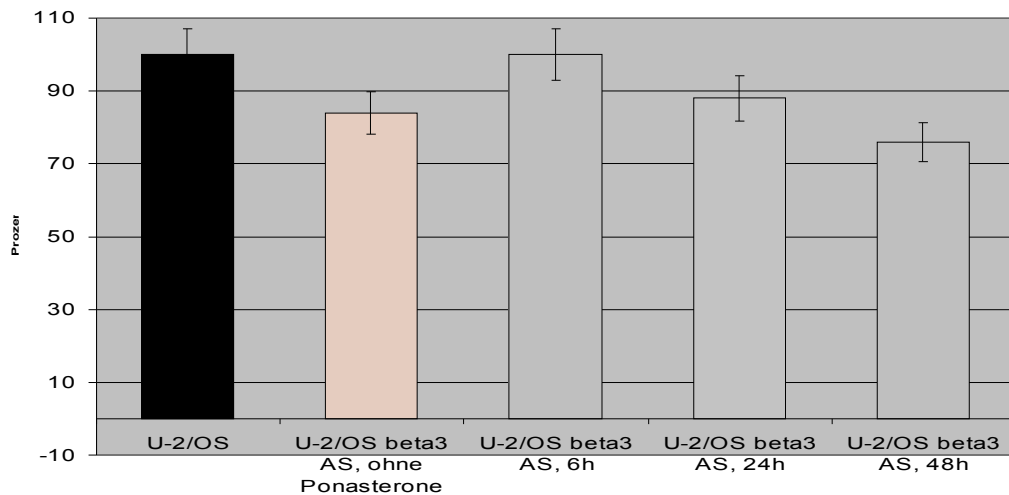


Abbildung 3.2.2.3-3: Balkenhistogramm der relativen Menge Phospholipase C $\beta 3$.

Die obige Abbildung zeigt die histogrammische Verdeutlichung der im Western-Blot Verfahren gewonnenen Daten. Als Referenzwert wurde hierbei die in U-2/OS Wildtyp Zellen vorkommende Menge der Phospholipase C $\beta 3$ zugrunde gelegt. Die Angaben zeigen einen Durchschnitt aus $n = 3$ Western-Blots. Es werden relative Werte dargestellt, die mit Hilfe einer Blotauswertungssoftware (Scion Image) gewonnen wurden.

3.2.2.4 Die PLC $\beta 1$ in MG-63 und in MG-63 $\beta 1$ Antisense Zellen

	MG-63	MG-63 $\beta 1$ AS
Lysezeitpunkt der Zellkulturen Splitting = Zeitpunkt 0h:	24 h	6 h nach Ponasteronezugabe
		24 h nach Ponasteronezugabe
		48 h nach Ponasteronezugabe
		ohne Ponasterone Zugabe

Die Ponasteronekonzentration im Medium betrug 10 μ M. Die erwartete Größe der Phospholipase C $\beta 1$ liegt bei einer Länge von 1216 Aminosäuren bei einem Molekulargewicht von 150 kDa. Die gefundene Größe des antigenen Molekülteils liegt bei 60 kDa. Zu dieser Diskrepanz existieren in der Literatur keine Angaben.

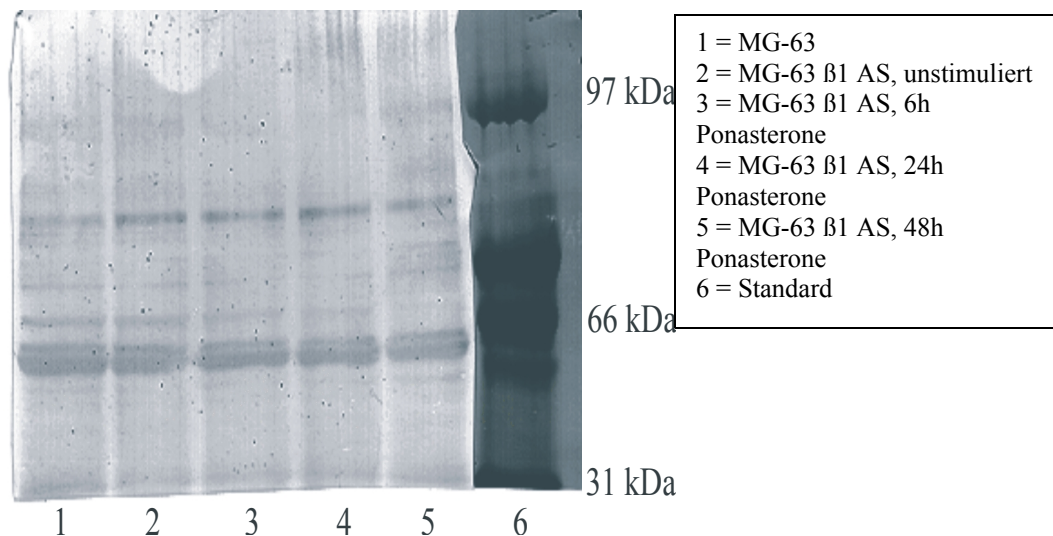


Abbildung 3.2.2.4-2: Western Analyse der Phospholipase C $\beta 1$ in der Osteosarkomzelllinie MG-63 und in MG-63 $\beta 1$ -Antisense Zellen.

Die immunologische Detektion fand mit polyklonalen Phospholipase C β 1 Antikörpern statt. Die anschließende Färbung wurde mit BCIP / NBT durchgeführt.

Eine maximale Suppression von 29% wurde nach 24h erreicht. Ein Rebound-Phänomen findet sich nicht.

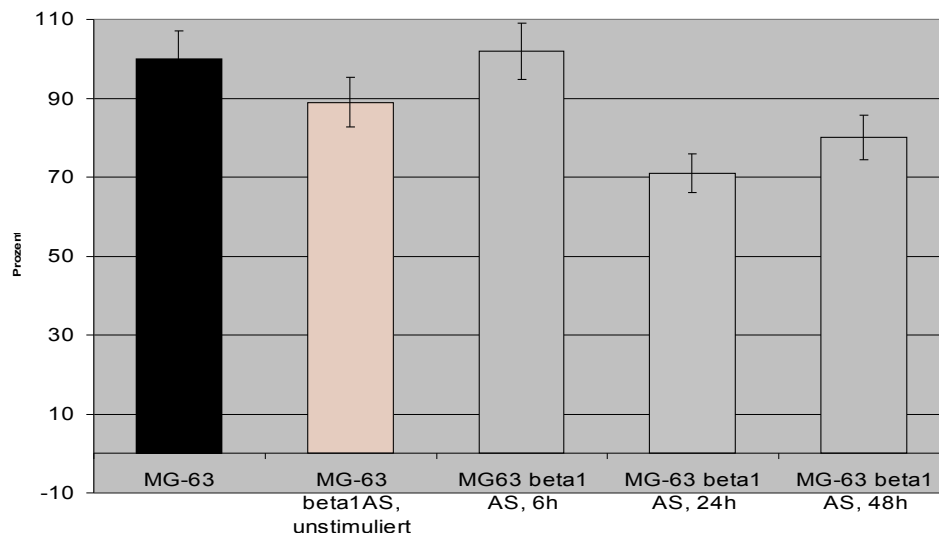


Abbildung 3.2.2.4-3: Balkenhistogramm der relativen Mengen Phospholipase C β 1.

Die obige Abbildung zeigt die histographische Verdeutlichung der im Western-Blot Verfahren gewonnenen Daten. Als Referenzwert wurde hierbei die in MG-63 Zellen des Wildtyps vorkommende Menge der Phospholipase C β 1 zugrunde gelegt. Die Angaben zeigen einen Durchschnitt aus $n = 2$ Western-Blots. Es werden relative Werte dargestellt, die mit Hilfe einer Blotauswertungssoftware (Scion Image) gewonnen wurden.

3.2.2.5 Die PLC β 2 in MG-63 und in MG-63 β 2 Antisense Zellen

	MG-63	MG-63 β 2 AS
--	-------	--------------------

Lysezeitpunkt der Zellkulturen Splitting = Zeitpunkt 0h:	24 h	6 h nach Ponasteronezugabe
		24 h nach Ponasteronezugabe
		48 h nach Ponasteronezugabe
		ohne Ponasterone Zugabe

Die Ponasteronekonzentration im Medium betrug 10 μ M.

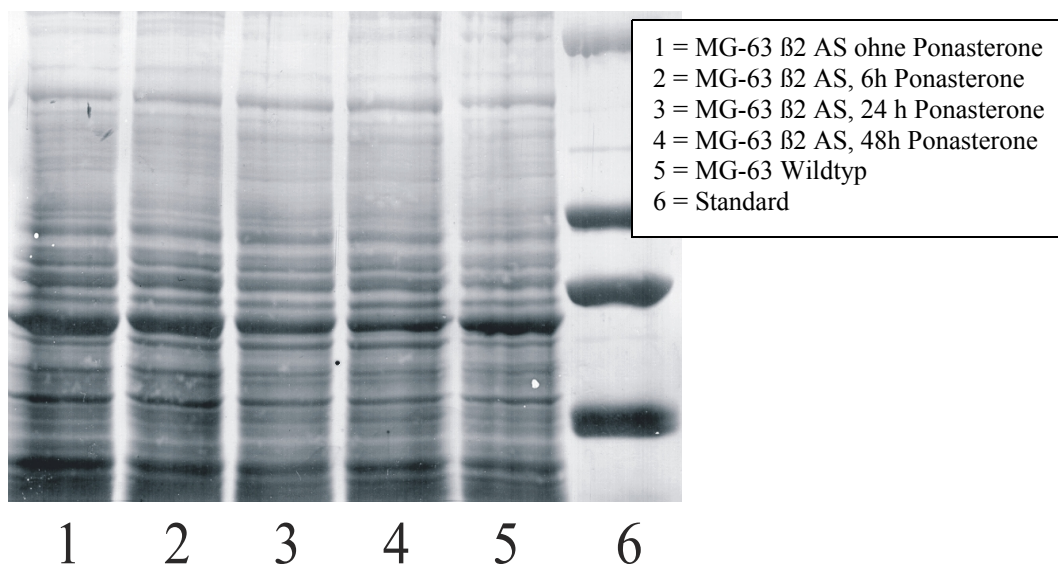


Abbildung 3.2.2.5-1: Unspezifische Ponceau-S Färbung nach Western-Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran.

Die Färbung dient der Dokumentation eines gleichmäßigen Auftrages von 50 μ g Protein auf allen Bahnen

Die erwartete Größe der Phospholipase C β 2 in der Western-Analyse liegt bei einer Kettenlänge von 1181 Aminosäuren bei einem Molekulargewicht von 163 kDa. Das gefundene Signal liegt bei 55 kDa. Zu dieser Diskrepanz existieren in der Literatur keine Angaben.

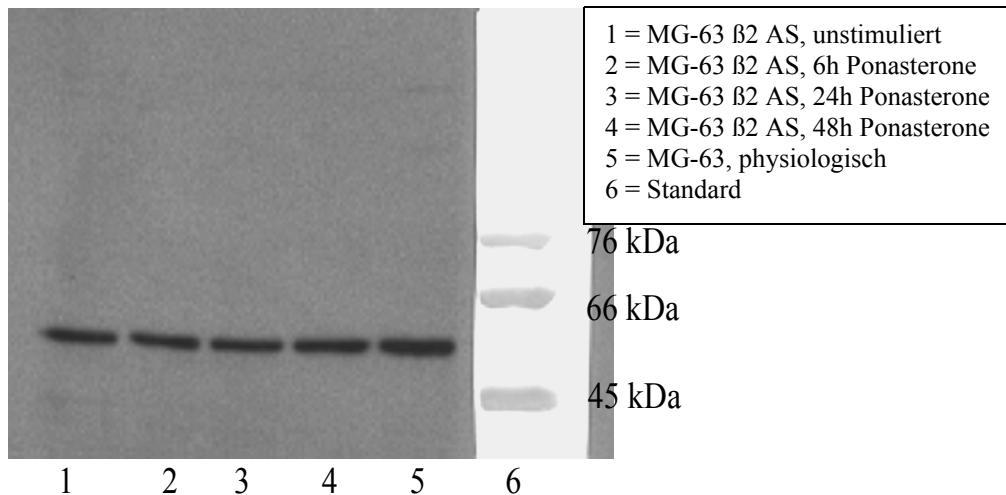


Abbildung 3.2.2.5-2: Western Analyse der Phospholipase C β 2 in der Osteosarkomzelllinie MG-63 und in MG-63 β 2-Antisense Zellen.

Die immunologische Detektion fand mit polyklonalen Phospholipase C β 2 Antikörpern statt. Die anschließende Färbung wurde mit dem Chemilumineszenz Kit der Firm ICN durchgeführt.

Es fällt auf, dass auch in nicht mit Ponasterone stimulierten Zellen die Basalaktivität des Antisense Vektors ausreicht, die vorhandene Menge Phospholipase C β 2 um 25% zu supprimieren. Hierbei wurde die vorhandene Menge Phospholipase C β 2 in MG-63 Zellen des Wildtyps zugrunde gelegt. Insgesamt konnte die stärkste Unterdrückung dieses Isoenzymes in den Antisense Zelllinien nach 24 Stunden beobachtet werden.

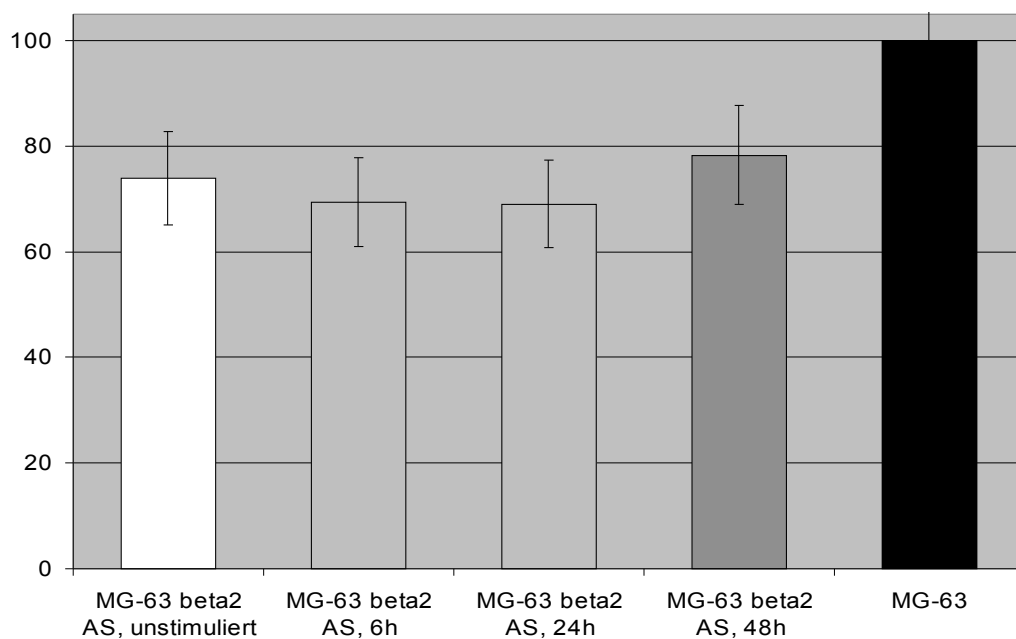


Abbildung 3.2.2.5-3: Balkenhistogramm der relativen Menge Phospholipase C $\beta 2$ in MG-63 Osteosarkomzellen.

Die obige Abbildung zeigt die histografische Verdeutlichung der in $n=3$ Experimenten gewonnenen Ergebnisse der Suppression der Phospholipase C $\beta 2$ in MG-63 Osteosarkomzellen. Es werden relative Werte dargestellt, die mit Hilfe der Western Blot Bildauswertungssoftware Scion Image der Firma Scion Corporation ermittelt wurden.

3.3 Dehnungsexperimente mit Antisense Zellen

Im Folgenden werden die MG-63 Antisense Zellen und ihr Verhalten bei Dehnung in physiologischen Größenordnungen beobachtet. Zugrunde gelegt werden hier die Dehnungsexperimente mit den Wildtyp Zellen unter Kenntnis des in 3.2.2.4 und 3.2.2.5 beobachteten Knockouts der Phospholipase C in MG-63 Antisense Zellen.

Im Folgenden werden die Ergebnisse des MTT-Proliferationsassays dargestellt. Jede Zellart wurde hierbei mehrmals dem oben geschilderten Belastungszyklus ausgesetzt. Die Veränderungen der Proliferationsraten können hier abgelesen werden. Verglichen werden jeweils die Extinktionen aus 8 Löchern einer

gedehnten 9-Loch-Dehnungsplatte mit Antisense Zellen mit den Extinktionen von 8 Löchern einer Kontrollplatte, die nicht gedehnt wurde. Die Testgrößen beziehen sich auf den Rangreihentest von Mann und Whithney.

3.3.1 Proliferationsassay MG-63 β 1-AS

MG63 beta1 AS	gedehnt	ungedehnt	gedehnt	ungedehnt
	0,262	0,220	0,378	0,210
	0,323	0,235	0,361	0,185
	0,343	0,257	0,234	0,194
	0,267	0,241	0,327	0,183
	0,286	0,102	0,338	0,198
	0,331	0,214	0,294	0,241
	0,320	0,282	0,380	0,213
	0,303	0,236	0,295	0,226
Mittelwert	0,304375	0,223375	0,325875	0,20625
Standard-abweichung	3,01%	5,35%	4,99%	2,02%
Differenz	36,26%		58%	
Testgröße $T=UX^1$	62		63	
UY	2		1	
Signifikanz	Signifikant		Signifikant	

¹Unterer kritischer Wert = 13; oberer kritischer Wert = 51; $\alpha = 0,05$

Die hier getesteten Zellen der humanen Osteosarkomzelllinie MG-63, die zusätzlich die Vektoren für eine steuerbare Antisense Expression gegen die Phospholipase C β 1 haben, zeigen in den zwei durchgeführten Dehnungsexperimenten mit anschließendem MTT-Proliferationsassay eine signifikante Steigerung der Proliferationsrate und der Stoffwechselaktivität. Die Antisense exprimierenden Zellen wurden über die gesamte Experimentdauer mit 10 μ M Ponasterone enthaltendem Medium inkubiert.

3.3.2 Proliferationsassay MG-63 β 2-AS

MG63 β 2-AS	gedehnt	ungedehnt	gedehnt	ungedehnt	gedehnt	ungedehnt
	0,499	0,487	0,581	0,812	0,446	0,672
	0,615	0,485	0,675	0,667	0,326	0,542
	0,626	0,334	0,636	0,605	0,406	0,590
	0,589	0,558	0,452	0,454	0,413	0,632
	0,556	0,498	0,670	0,593	0,347	0,721
	0,496	0,622	0,436	0,600	0,281	0,662
	0,520	0,542	0,469	0,664	0,330	0,709
	0,505	0,390	0,761	0,563	0,541	0,590
Mittelwert	0,55075	0,4895	0,585	0,61975	0,38625	0,634125
Standard-abweichung	5,34%	9,2%	12,09%	10,22%	8,28%	6,14%
Differenz	12,51%		-5,61%		-39,09%	
Testgröße $T=UX^1$	47		29		0	
UY	17		35		63	
Signifikanz	Nicht signifikant		Nicht signifikant		Signifikant	

¹Unterer kritischer Wert = 13; oberer kritischer Wert = 51; $\alpha = 0,05$

Die hier getesteten Zellen der humanen Osteosarkomzelllinie MG-63, die zusätzlich die Vektoren für eine steuerbare Antisense Expression gegen die Phospholipase C β 2 haben zeigen in den drei durchgeführten Dehnungsexperimenten mit anschließendem MTT-Proliferationsassay eine nicht signifikante Veränderung der Proliferationsrate und der Stoffwechselaktivität. Die gedehnten Antisense exprimierenden Zellen wurden über die gesamte Experimentdauer mit 10 μ M Ponasterone enthaltendem Medium inkubiert.

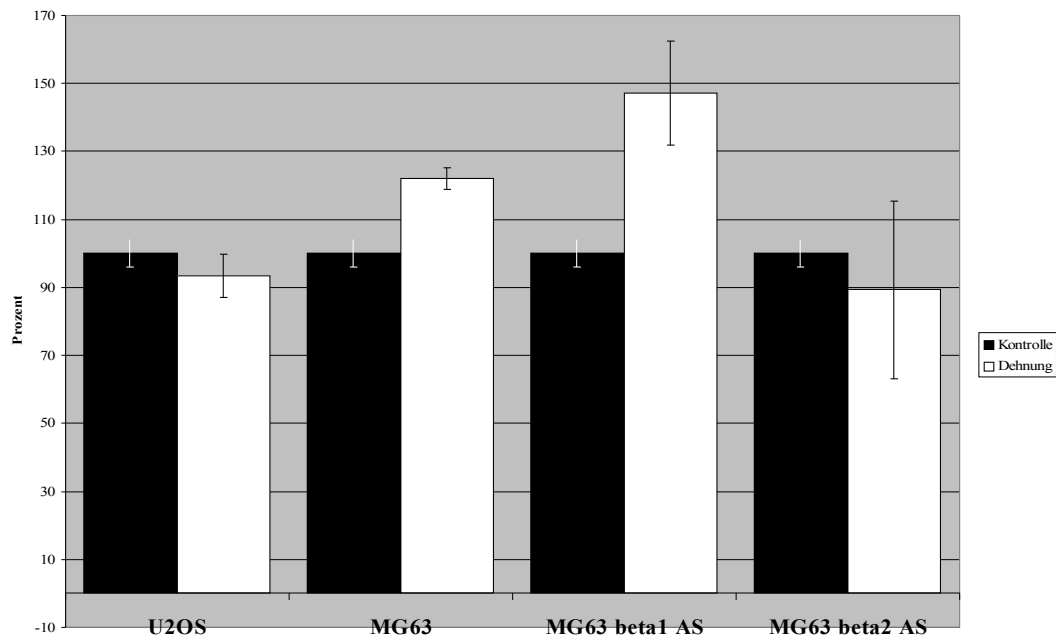


Abbildung 3.3.2-2: Balkenhistogramm der Proliferationsassays

Das oben abgebildete Histogramm gibt das Ergebnis der Proliferationsassays wieder. Hierbei wurde jeder Zelltyp mindestens drei mal experimentell beobachtet. Dargestellt ist das Verhalten der gedehnten Zellen (weiße Balken des Histogramms) gegen eine Kontrolle, die nicht gedehnt wurde (schwarze Balken im Histogramm). Die Zelllinien U-2/OS und MG-63 $\beta 2$ AS zeigten eine nicht signifikante Änderung des Proliferationsverhaltens als Antwort auf den oben beschriebenen Dehnungszyklus. Die Zelllinien MG-63 und MG-63 $\beta 1$ -AS zeigten eine signifikante Steigerung der Proliferationsaktivität.

4 Diskussion

Mechanische Belastung in der Umgebung des Knochens führt zu dessen adaptivem Umbau. Die hierfür notwendige Synthese neuer Knochensubstanz wird von Zellen der Osteoblasten-Entwicklungslinie geleistet. Die ebenfalls zum adaptiven Umbau gehörende Resorption von Knochensubstanz im Sinne eines optimalen Verhältnisses von Gewicht zu Stabilität wird von den vielkernigen Osteoklasten durchgeführt.

Das komplexe System der Knochenhomöostase wird zusätzlich durch eine große Anzahl von Hormonen und Wachstumsfaktoren beeinflusst. Diese greifen regulierend in die Umbauvorgänge des Knochens ein. Zusammen mit mechanischen Kräften fördern diese humoralen und lokalen Faktoren bei Belastung die Knochensynthese. Bei Entlastung, wie bei der pathologischen Altersosteoporose, führen die genannten Faktoren zu degenerativen Veränderungen des Knochens.

Die reife, von Knochenmatrix umgebene Form der Osteoblasten sind die Osteozyten. Diese werden auf zellulärer Ebene als mechanosensitive Strukturen erkannt. Unterschiedliche externe mechanische Stimuli führen auch in Osteoblasten zu intrazellulären Vorgängen, die in einer erhöhten Proteinsynthese und einer verstärkten Zellproliferation resultieren. Osteozyten sollen bei der Übertragung des extrazellulären Reizes auf Osteoblasten eine entscheidende Rolle spielen. Zur Zeit existieren mehrere Modellvorstellungen, die diesen physikalischen Übertragungsmechanismus beschreiben. Der genaue Mechanismus der Umsetzung des mechanischen extrazellulären Reizes in eine biochemische zelluläre Antwort ist jedoch ungeklärt. Ebenfalls ungeklärt ist die weitere Umsetzung in die oben beschriebenen lokale und humorale Faktoren des Knochenumbaus.

In der Literatur existieren unterschiedliche Angaben für die physiologische Belastung des Knochens. Lanyon und Smith definieren eine dynamische Belastung mit $2000\mu\epsilon$ (0,2% Längendehnung) bei 20 Dehnungszyklen pro Tag und einer Frequenz von 0,5Hz als physiologischen Reiz (Lanyon & Smith 1970;

Lanyon et al. 1975). Diese Werte wurden durch in vivo Implantation von Dehnungsmessstreifen beim Huhn und beim Menschen ermittelt. Hierunter findet weder eine Ab- noch eine Zunahme der Knochengrundsubstanz statt. In Zellkulturen von Osteoblasten und Osteosarkomzellen führt eine Belastung von 3000 $\mu\epsilon$ bis 4000 $\mu\epsilon$ bei 30 Zyklen pro Tag mit einer Frequenz von 1Hz zu einer Zunahme der Proteinbiosynthese sowie der Proliferationsrate (Jones et al. 1991). Mechanische Reize führen in Osteoblasten zur Aktivierung intrazellulärer Signalsysteme. So verändert sich die Konformation verschiedener Ionenkanäle; die Adenylat-Zyklase und die phosphoinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) werden aktiviert. Hierdurch wird die Produktion verschiedener „Second messenger“ wie Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP3) induziert. Diese sekundären Botenstoffe regulieren ihrerseits die Aktivität verschiedener Kinasen und die Konzentration intrazellulärer Ionen. Vor Allem die Kinasen ERK1 und ERK2 scheinen hier eine entscheidende Rolle zu spielen. Durch sie werden Transkriptionsfaktoren wie c-fos und egr-1 induziert. Die langfristigen Folgen dieser durch mechanische Stimuli aktivierten Signalkaskaden stellen die Zunahme der Proliferation und die zelluläre Differenzierung dar. So wird die Expression von Kollagen Typ I gesteigert und die Osteokalzinexpression nimmt ab (Jones et al. 1991; Schmidt et al. 1998; Somjen et al. 1980).

Es steht fest, dass oben genannte Signalkaskaden durch mechanische Stimulation von Osteozyten und Osteoblasten initiiert werden. Der Mechanismus, welcher den mechanischen Reiz in eine biochemische Antwort auf zellulärer Ebene vermittelt, ist bis heute nicht bekannt.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit Grundlagenuntersuchungen zu einem kleinen Teil der oben genannten Signalkaskaden. Aufbauend auf der Etablierung eines Modellsystems zur Inhibierung der phosphoinositol-spezifischen Phospholipase C werden hier die so veränderten Osteosarkomzellen untersucht. Die Expression der Phospholipase C und die zelluläre Antwort auf externe mechanische Reize werden mit den Eigenschaften von Osteosarkomzellen des Wildtyps verglichen und beschrieben.

4.1 Auswahl eines geeigneten Systems zur Zellkultur

Obwohl Zellkulturen schon seit mehr als neunzig Jahren zu wissenschaftlichen Untersuchungen benutzt werden (Harrison 1907), ist die Osteoblasten-Zellkultur erst seit den 60er Jahren Routine (Peck et al. 1964). Durch die Weiterentwicklung der Knochenzellkulturen wurde ihre Benutzung zu einem vielgenutzten wissenschaftlichen Werkzeug.

Zur Untersuchung mechanischer Eigenschaften von Osteoblasten ist die Auswahl eines geeigneten Modellsystems kritisch. Im Folgenden soll diskutiert werden, unter welchen Voraussetzungen ein Zellkultursystem mit Osteosarkomzellen zur Gewinnung neuer Erkenntnisse bezüglich der Mechanosensitivität von Knochenzellen herangezogen werden kann.

In der bekannten Literatur existieren mehrere etablierte Modelle zur Zellkultur osteogener Zellen. Zellkulturen, die mit Osteoblasten oder osteoblastenähnlichen Zellen arbeiten, wurden von mehreren Zelllinien etabliert. Die beschriebenen Kulturen benutzen neben primären Zellen nichttransformierte klonale Zellen, aber auch Osteosarkomzelllinien. Trotz der Vielfalt der benutzten Zellen ähneln sich die Kulturmethode jedoch stark. Sie lehnen sich in den meisten Methoden (Zusammensetzung des Mediums, Serumtyp und Konzentration, Antibiotikum usw.) an die Kulturmethode für Fibroblasten nach Freshney an (Freshney 1987).

Ein geeignetes Untersuchungsmodell muss verschiedene Kriterien erfüllen:

Der Phänotyp der osteogenen Zellen muss gesichert sein.

Die kurz- und langfristigen Veränderungen der Zellen nach Applikation mechanischer Reize sollte gut reproduzierbar sein.

Einige der etablierten Zelllinien zeigen in der Gegenüberstellung der Antwort auf mechanische Reize nicht die geforderten Eigenschaften. Ihnen fehlt Mechanosensitivität, welche für Versuche im Rahmen dieser Arbeit unabdingbar ist.

Bei der Auswahl einer Osteosarkomzelllinie oder eines Modells mit primären Zellen sind einige Vor- und Nachteile zu beachten. So sind die phänotypischen Eigenschaften von Primärkulturen intensiv untersucht. Antworten auf Hormone (Parathormon, Kalzitinin) und Wachstumsfaktoren (Fibroblast growth factor) wurden anhand von Untersuchungen mit Primärkulturen gewonnen (Baylink et al.

1993; Talmage & Meyer 1967; Canalis & Raisz 1980; Milhaud et al. 1965). Auch das Wissen über Signaltransduktionswege resultiert hieraus. Die Nachteile der Primärkultur liegen in der Inhomogenität der einzelnen Präparationen. Außerdem ist sowohl die Präparation als auch die Arbeit mit der primären Zellkultur sehr aufwendig. Weiterhin beeinflusst das verwendete Kälberserum die Differenzierung der Zellen enorm.

Einige Nachteile der Kultivierung von Primärzellen können mit der Verwendung einer Zellkultur mit Osteosarkomzellen überwunden werden. Im Rahmen der ersten Untersuchungen zur Parathormon-Empfindlichkeit der Adenylatzyklase wurden Zellen eines Knochentumors der Ratte als Osteosarkomzelllinie isoliert und mit ROS bezeichnet (Majeska et al. 1981). Diese Zellen zeigen zum großen Teil osteoblastisches Verhalten auf Hormonstimulation, haben jedoch einen hiervon unterschiedlichen Phänotyp. Die ebenfalls in dieser Arbeit verwendeten Zellen der humanen Osteosarkomzelllinie MG-63 wurden im Rahmen einer weiteren Studie benutzt, die sich mit der Integrin-vermittelten Zelladhäsion beschäftigt (Dedhar et al. 1987). Hier zeigten die Osteosarkomzellen ein osteoblasten-ähnliches Verhalten.

Die Zellen eines Osteosarkoms ähneln Osteoblasten (D. B. Jones, persönliche Mitteilung). Sie erscheinen histologisch als sarkomatöses Stroma mit spindelförmigen Zellen. Sie sind in der Lage das gesamte Spektrum des knochenbildenden Mesenchyms zu bilden. Die im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Osteosarkomzellen sind nur zum Teil hinsichtlich ihrer osteoblastären Eigenschaften untersucht. Genaue Phänotypisierungen existieren lediglich für die Zelllinien Sa-OS-2 (Rodan et al. 1987) und die OHS-4 Zelllinie (Fournier & Price 1991). Im Unterschied hierzu sind die in dieser Arbeit benutzten MG-63 und U-2/OS bisher kaum phänotypisiert.

Die wesentlichen Vorteile beim Arbeiten mit Osteosarkomzellen liegen in der extrem einfachen Kultivierung und der Stabilität des Phänotyps. Ein Drift des Phänotyps mit Heteroploidie der Zellen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Außerdem sind bei Osteosarkomzelllinien oft keine Informationen zur Ähnlichkeit des untransformierten Zelltyps vorhanden. Die zur malignen Transformation der Zelllinie führende Ursache ist ebenfalls oft nicht bekannt.

Nach Abwägung der Vor- und Nachteile der Kultivierung primärer Zellen gegenüber einer Osteosarkomzelllinie erschien die Auswahl einer Osteosarkomzelllinie für das Ziel dieser Arbeit sinnvoll. Zur Untersuchung der Mechanotransduktion in Osteoblasten wurde das Modell der Osteosarkomzellkultur gewählt. Untersuchungen zur Mechanotransduktion in primären Osteoblasten sind mehrfach in der Literatur beschrieben (Jones et al. 1991; Brighton et al. 1991; Harell et al. 1977). Die Verwendung von Osteosarkomzellen würde jedoch die Kultivierungsbedingungen enorm vereinfachen. Hierdurch ergeben sich natürlich auch Erleichterungen für das weitere experimentelle Vorgehen.

So finden sich in der Literatur einige Beschreibungen von Dehnungsexperimenten mit Osteosarkomzellen. Diese legen ihre Schwerpunkte auf die Kalziumantwort der aus Ratten gewonnenen ROS 17/2.8 Osteosarkomzellen und der humanen OHS-4 Sarkomzellen nach Dehnung (Harter et al. 1995; Vadiakas & Banes 1992). Außerdem wurde der Proteinstoffwechsel anhand der ERK1/2-Aktivierung und der Phosphorylierung von Tyrosin in U-2/OS-Zellen nach deren mechanischer Stimulierung untersucht (Schmidt et al. 1998). Hier wurden jedoch zum Teil deutlich über physiologischen Größen liegende mechanische Kräfte auf die Zellen ausgeübt. Außerdem können von dem verwendeten Flexercell-System (Flexcell Int. Corp., Hillsborough, NC, USA) die externen Kräfte nicht homogen auf die Zellkulturen übertragen werden. Kräfte in den hier verwendeten hyperphysiologischen Bereichen führen bei Osteoblasten zu Differenzierungsvorgängen in Richtung eines fibroblastenähnlichen Phänotyps (Jones et al. 1991).

Osteoblasten sind unter Anderem durch eine Erhöhung ihrer Proliferationsrate nach Applikation eines Dehnungsreizes gekennzeichnet (Hasegawa et al. 1985; Jones et al. 1991). In einem Modell mit Osteosarkomzellen zur Analyse der Mechanotransduktion ist diese bei den Osteoblasten bekannte Mechanosensitivität eine entscheidende Grundvoraussetzung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Osteosarkomzelllinien und deren Minusvarianten (in der vorliegenden Arbeit als Antisense-Zellen oder Knockout-Zellen bezeichnet) einem Proliferationsassay

unterzogen und die gewonnenen Werte sowohl untereinander als auch mit den Ergebnisse von Proliferationsassay primärer Osteoblasten verglichen. In den oben gezeigten Tabellen werden die Teilungsraten unter mechanischer Belastung von verschiedenen Osteosarkomzellen und Osteoblasten verglichen. Außerdem wird das Proliferationsverhalten der MG-63 Osteosarkomzellen dem der zwei Knockout-Varianten MG-63 β 1-AS und MG-63 β 2-AS gegenübergestellt. In ersten Versuchen wurde gezeigt, dass U-2/OS Osteosarkomzellen auf eine Belastung im physiologischen Bereich keine Erhöhung der Proliferationsrate im Vergleich zu nicht belasteten Zellen des gleichen Typs zeigen. Im Gegensatz hierzu reagierten die humanen Osteosarkomzellen der Linie MG-63 mit einer Steigerung der Mitoserate von 25%. Die Größenordnung der Steigerung der Proliferationsrate lag im Bereich derer von primären bovinen Osteoblasten. Obwohl in einigen Versuchen der Kalziumstoffwechsel und die Aktivität von einzelnen zellulären Enzymen in Osteosarkomzellen untersucht wurden (Harter et al. 1995; Vadiakas & Banes 1992; Schmidt et al. 1998), liegen bislang keine gesicherten Daten zum Proliferationsverhalten nach mechanischer Belastung vor. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten MG-63 Zellen zeigten trotz des unterschiedlichen Verhaltens nach mechanischer Belastung im Vergleich zu anderen Osteosarkomzellen keine wesentlichen Unterschiede zu diesen im Phänotyp (Hara et al. 1996; Tsuchiya et al. 1993).

Die Ergebnisse der Dehnungsexperimente scheinen die Osteosarkomzelllinie MG-63 als eine Alternative zum Modell der primären bovinen oder humanen Osteoblasten im Dehnungssystem auszuweisen. Ein solches wurde bereits von Peake et al benutzt (Peake et al. 2000). Zellen der Osteosarkomzelllinie MG-63 weisen eine ähnliche Reaktion in der Aktivitätszunahme im Dehnungsexperiment wie die primären bovinen Osteoblasten auf. Außerdem ist das Expressionsmuster für die PLC identisch (M. Hoberg, Experimentelle Orthopädie und Biomechanik, Universität Marburg, persönliche Mitteilung). Bei in unserem Labor durchgeführten Experimenten in einer Flusskammer zeigten die MG-63 Osteosarkomzellen zu primären bovinen Osteoblasten vergleichbare intrazelluläre Kalziumanstiege bei Erhöhung der Flussrate (M. Noll, Experimentelle Orthopädie und Biomechanik, Universität Marburg, persönliche Mitteilung). Auch die nach

Belastung für primäre bovine Osteoblasten typische Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade konnte in MG-63 nachgewiesen werden (B. Bromme, Experimentelle Orthopädie und Biomechanik, Universität Marburg, persönliche Mitteilung). Es wurden jedoch auch unterschiedliche Reaktionsmuster der MG-63 Zellen nach mechanischer Reizapplikation gezeigt (J. Tenbosch, Experimentelle Orthopädie und Biomechanik, Universität Marburg, persönliche Mitteilung).

Jedoch sind hier weitere Experimente notwendig, die zum einen klären, ob das hier benutzte System sich als Modell halten lässt. Desweiteren ist es sicherlich sinnvoll, die hier durchgeführten Versuche auch mit primären Osteoblasten durchzuführen. So kann geklärt werden, inwieweit das hier benutzte System mit MG-63 Osteosarkomzellen einen Ersatz des Primärmodells bieten kann.

4.2 Die Rolle der Phospholipase C in der Mechanotransduktion

In ihrer ausführlichen Betrachtung der phosphoinositolspezifischen Phospholipase C beschreiben Rebecchi und Pentyala deren entscheidende Rolle bei verschiedenen zellulären Signaltransduktionsmechanismen. So spielt die Phospholipase C eine Rolle bei der Signaltransduktion durch Hormone, Interleukine und bei anderen, meist rezeptorvermittelten Agonisten (Rebecchi & Pentyala 2000).

Jedoch scheint ihre entscheidende Rolle im Zellmetabolismus sich nicht nur hierauf zu beschränken. Jones et al. zeigten die Aktivierung der Phospholipase C und die Bildung von sekundären Botenstoffen wie Diazylglyzerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) durch die Hydrolyse von Phosphoinositolbisphosphat. Das hieraus gebildete Inositol-1,4,5-trisphosphat spielt eine entscheidende Rolle im intrazellulären Kalziumstoffwechsel. Diazylglyzerol wiederum aktiviert die Protein Kinase C (persönliche Mitteilung D. B. Jones, Labor für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik, Philipps-Universität Marburg).

In ihren umfangreichen Betrachtungen der Phospholipase C beschreiben mehrere Autoren mindestens vier Subtypen der Phospholipase C. Diese Subtypisierung geschieht anhand mehrerer Merkmale der verschiedenen Formen. Hierzu gehören unter Anderem die DNS-Sequenz und biochemische Merkmale wie die

unterschiedlichen Aktivierungswege. Diese werden als β -, γ -, δ - und ϵ -Familien bezeichnet (Lopez et al. 2000; Rhee et al. 1989). Die β - und die δ -Familien bestehen aus jeweils vier Isoenzymen. Von der γ -Isoform sind bislang zwei Isoformen bekannt. Das zuletzt entdeckte Mitglied der Phospholipase C-Familie wurde mit dem Buchstaben ϵ bezeichnet. Hier ist ein Isoenzym isoliert worden.

Die im Labor der Experimentellen Orthopädie und Biomechanik Marburg durchgeführten Versuche zeigten anhand der Northern-Transfer-Analyse (Northern-Blot) das Verteilungsmuster der verschiedenen Phospholipase C Isoformen in den unterschiedlichen in dieser Arbeit benutzten Zelltypen (Persönliche Mitteilung und gemeinsame Ergebnisse mit Maik Hoberg). Dieses wird in folgender Tabelle dargestellt:

	U-2/OS	MG-63	HOB
PLC β 1	+	+	+
PLC β 2	-	+	+
PLC β 3	+	+	+
PLC β 4	Keine Ergebnisse	Keine Ergebnisse	Keine Ergebnisse
PLC γ 1	+	+	+
PLC γ 2	-	+	-
PLC δ 1	+	+	+
PLC δ 2	Keine Ergebnisse	Keine Ergebnisse	Keine Ergebnisse
PLC δ 3	Keine Ergebnisse	Keine Ergebnisse	Keine Ergebnisse
PLC δ 4	Keine Ergebnisse	Keine Ergebnisse	Keine Ergebnisse
PLC ϵ	Keine Ergebnisse	Keine Ergebnisse	Keine Ergebnisse

Von der Phospholipase C β 1 existieren zwei Splice-Varianten mit unterschiedlichen Größen (Bahk et al. 1994), die auch hier nachgewiesen wurden. Knockout-Mäuse, denen die Isoformen Phospholipase C β 1 und Phospholipase C β 3 fehlen, sterben spätestens am neunten Tag der Embryogenese (Kim et al. 1997; Wang et al. 1998). Diese beiden Isoformen scheinen eine entscheidende Rolle in der Embryogenese zu spielen. Ebenfalls für eine regelhafte embryonale Entwicklung (Ji et al. 1997) sowie die Signaltransduktion verschiedener Agonisten wie Platelet-derived Growth Factor ist das Vorhandensein der ubiquitär vorkommenden Phospholipase C γ 1 essentiell. Sie scheint ebenfalls in der

Modifizierung der anderen phosphoinositol-spezifischen Phospholipase C Isoformen eine Rolle zu spielen (Rebecchi & Pentyla 2000).

Die Hauptaufgaben der Phospholipase C $\gamma 2$ liegen in der Signaltransduktion hämatopoetischer Zellen (Emori et al. 1989; Homma et al. 1989).

Die Phospholipase C $\beta 2$ ließ sich in mehreren Zelltypen mit unterschiedlicher Signalstärke nachweisen. In der Literatur gibt es erste Hinweise auf unterschiedliche Splice-Varianten dieser Isoform (Mao et al. 2000). Weitere Experimente werden sich mit den hier in Osteosarkomzellen gefundenen Größenunterschieden beschäftigen. Die in der obigen Tabelle fehlenden Isoformen $\beta 4$, $\delta 2$, $\delta 3$ und $\delta 4$ sowie ϵ konnten in der Northern-Transfer-Analyse nicht nachgewiesen werden. Auch in der gängigen Literatur ist das Expressionsmuster dieser Isoenzyme in Osteosarkomzellen und Osteoblasten nicht beschrieben.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Western-Analysen konnten die Isoformen $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 3$ in den Osteosarkomzellen MG-63 nachweisen. In U-2/OS Zellen konnten die Isoformen $\beta 1$ und $\beta 3$ gefunden werden. Für die Isoform $\beta 2$ konnte kein eindeutiger Nachweis geführt werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Northern-Blot Analysen von Dr. med. Hoberg (persönliche Mitteilung). Allerdings zeigten die hier untersuchten Phospholipase C Isoenzyme bei der Proteinelektrophorese nicht die in der Literatur beschriebenen Molekulargewichte von ungefähr 150 kDa (Rebecchi & Pentyla 2000). Hierfür existieren mehrere mögliche Erklärungen. Die Isoenzyme der Familie β besitzen eine relativ starke Bindung an die Zellmembran. Um sie für die Proteinchemie hiervon zu lösen wurde ein sehr aggressives Lyseverfahren mit einem hohen Salzgehalt des Lysepuffers angewandt. Hierdurch sind möglicherweise kürzere Proteinfragmente entstanden, die dann im Western-Blot-Verfahren nachgewiesen wurden. Dieses Phänomen beschreiben LeMalley et al. nicht, von denen das Lyseverfahren adaptiert wurde (LeMellay et al. 1997). Allerdings wurden in diesen Experimenten andere Antikörper verwendet. Die in der Western-Analyse gefundenen Doppelbanden für die Phospholipase C $\beta 1$ in MG-63 reflektieren das im Northern-Blot gefundene Bild zweier Splice-Varianten dieses Enzyms. Allerdings kann von den im Western Blot gefundenen zwei Banden nicht auf zwei

Splice-Alternativen zurückgeschlossen werden, da nicht bekannt ist, an welche der zwei möglichen Proteinfragmente sich der kommerziell erhältliche Antikörper bindet (möglicherweise an beide?). Für das gesamte Spektrum der Western-Analyse der Phospholipase C in Osteosarkomzellen existieren in der Literatur wenig Daten. Der Vergleich der hier gewonnen Daten mit den Ergebnissen der Northern-Analyse zeigen jedoch für alle untersuchten Isoformen identische Expressionsmuster.

Bei der Zusammenschau der gewonnen Daten aus Dehnungsexperimenten mit der Vier-Punkt-Dehnungsmaschine, aus der Northern-Analyse sowie der Western-Analyse scheint der phosphoinositol-spezifischen Phospholipase C $\beta 2$ eine bedeutende Rolle beim Prozess der Mechanotransduktion der hier untersuchten Osteosarkomzellen zuzukommen. Sie ist sowohl mit der RNA-Analyse vom Northern Typ als auch in der Western-Analyse nur in mechanosensiblen humanen Osteoblasten und Osteosarkomzellen vom Typ MG-63 nachzuweisen. Interessant ist, dass die die Phospholipase C $\beta 2$ nicht exprimierende U-2/OS Wildtypzelllinie eine sehr heterogene Antwort auf mechanische Dehnungsreize gibt. Die Antwort auf Dehnungsreize reicht von Abnahme der Proliferationsrate bis zur Zunahme in der Größenordnung von primären bovinen Osteoblasten. Hier sind sowohl mögliche Splice-Varianten als auch weit komplexere Strukturen zu vermuten, die das Bild des Mechanotransduktionsmechanismus und der hieran beteiligten Phospholipase C Isoenzyme noch weiter komplizieren.

Bei allen vorhandenen Überlegungen zur Mechanotransduktion darf nicht außer Acht gelassen werden, dass der gesamte Vorgang eine äußerst komplexe konzertierte Aktion darstellt. Hier ist das exakte Zusammenspiel der bekannten Phospholipase C Isoformen noch zum Teil unklar (Rebecchi & Pentyala 2000). Auch muss daran gedacht werden, dass ein möglicherweise noch nicht bekanntes Isoenzym eine entscheidende Rolle spielen kann.

4.3 Entwicklung eines induzierbaren Knockout-Systems

Eine stabile Zellkultur mit Osteosarkomzellen der Zelllinie MG-63 bietet optimale Voraussetzungen zur Entwicklung eines neuartigen, regulierbaren Antisense-

Expressions-Systems. Ihre den primären Osteoblasten ähnelnden molekularbiologischen und physiologischen Eigenschaften machen sie zu einem geeigneten Modellsystem. Durch das etablierte Antisense-Modell konnte die Expression verschiedener Isoenzyme der Phospholipase C gezielt dadurch supprimiert werden, dass nach hormoneller Stimulation mit Ponasterone A Antisense mRNA an die exprimierte physiologische mRNA der Phospholipase C bindet und somit die Translation einschränkt. Ein solches System ist zur Zeit weder in der Literatur beschrieben, noch ist ein solches kommerziell erhältlich. In der Literatur beschriebene Antisense mRNA-Systeme benutzen zur Suppression des gewünschten Enzyms unterschiedliche Methoden. Haley et al. brachten mittels eines Mikroinjektors ein Antisense Konstrukt gegen die Isoenzyme $\beta 1$ und $\beta 4$ der Phospholipase C in den Zellkern. Die Reduktion der Menge des Zielenzym wurde durch dessen immunzytochemische Färbung nachgewiesen und bewegte sich zwischen 38% bis 70%. Die anderen Isoenzyme $\beta 2$ und $\beta 3$ wurden durch die Antisense Produktion nicht beeinflusst (Haley et al. 2000). Kritisch betrachtet werden muss hier die Benutzung des Mikroinjektors, welcher den Zellen einen erheblichen Schaden zufügen kann. Ein nicht induzierbares System benutzten Cocco et al. und Manzoli et al.. Sie untersuchten die Bedeutung der Phospholipase C für zelluläre Signaltransduktionswege im Zellkern mittels Antisense-Oligonukleotiden gegen die Phospholipase C $\beta 1$ (Cocco et al. 1999; Manzoli et al. 1997; Manzoli et al. 1999). Obwohl hier eine Induzierbarkeit fehlte, konnten mit dieser Methode jedoch hohe Suppressionsraten erzeugt werden.

Ein induzierbares Antisense System zur Suppression verschiedener Isoenzyme der Phospholipase C entwickelte Nebigil. Er konnte eine Reduktion der Zellproliferationsrate von Rattenhepatozyten durch Suppression der γ , δ und β Isoformen der Phospholipase C erreichen. Der Antisense mRNA exprimierende Vektor kann durch cAMP in seiner Aktivität verändert werden, welches keinen Einfluss auf die hier verwendeten Rattenhepatozyten haben soll (Nebigil 1997).

Hieraus ergab sich die Idee ein Antisensesystem für das Labor der experimentellen Orthopädie und Biomechanik zu entwickeln. Dies war vor allem durch die intensive Arbeit von J. Tenbosch und M. Hoberg möglich, die die Idee für ein solches System entwickelten und in ersten Versuchen zeigen konnten, dass

die Etablierung möglich ist. Sie konnten auch auf molekularbiologischer Ebene zeigen, dass Antisense mRNA in Osteosarkomzelllinien über mehrere Generationen stabil exprimiert wird (M. Hoberg, Experimentelle Orthopädie und Biomechanik, Philipps-Universität Marburg, persönliche Mitteilung).

Das im Rahmen dieser Arbeit benutzte System der Firma Invitrogen besteht aus zwei Komponenten (Ecdysone-Inducible Mammalian Expression System, Invitrogen, Niederlande). Zum einen dem Vektor pVgRXR, der für den Rezeptor des Insektenhäutungshormones Ponasterone kodiert und diesen dauerhaft exprimiert. Zum anderen der pIND(SP1) Vektor, der die Antisensesequenz gegen die spezifische Isoform der Phospholipase C enthält und dessen Transkriptionsaktivität durch den pVgRXR Rezeptor gesteuert wird.

Die Anwendung dieses Systems konnte in dieser Arbeit auf mehrere Isoenzyme der Phospholipase C ausgedehnt werden. Im Speziellen konnte das mit Ponasterone A induzierbare Antisense mRNA-System für die Phospholipase C Isoenzyme $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 3$ in Osteosarkomzellen der Linie MG-63 und U-2/OS etabliert werden.

Im Folgenden gelang eine stabile Kultivierung der so veränderten Zellen. Die Suppression der Isoenzyme wurde sowohl qualitativ als auch quantitativ im Western-Blot Verfahren gezeigt. Hier zeigten sich unterschiedliche Muster der exprimierten, unterdrückten Phospholipase C. In einigen Antisense-exprimierenden Osteosarkomzelllinien wie U-2/OS $\beta 2$ AS und MG-63 $\beta 3$ AS konnte keine Suppression der Phospholipase C beobachtet werden, obwohl für diese Zellen eine Expression der Antisense mRNA mit dem RT-PCR Verfahren gezeigt werden konnte (M. Hoberg, Experimentelle Orthopädie und Biomechanik, Philipps-Universität Marburg, persönliche Mitteilung). Hier lagen zum Teil chaotische Antworten der Zellen auf die Induktion der Antisense RNA vor. Möglicherweise spielen die hier supprimierten Phospholipase C-Isoenzyme derart wichtige Rollen im Signaltransduktionssystem, so dass deren Suppression einen ungeordneten Zellstoffwechsel zur Folge hat.

In anderen Osteosarkomzelllinien gelang die Etablierung eines induzierbaren Antisense-Systems mit hieraus folgender Suppression der Phospholipase C (MG-

63 β 1-AS und MG-63 β 2-AS). Hier konnte ebenso die Antisense-mRNA-Produktion mittels RT-PCR gezeigt werden. Auch die folgende Suppression der jeweiligen Isoenzyme in den Antisense-exprimierenden Zellen konnte qualitativ und quantitativ gezeigt werden. Die Größe der Suppression unterscheidet sich bei den unterschiedlichen Zelltypen. Bei den nicht mechanosensiblen U-2/OS Zellen rangierte der Knockout der Phospholipase C zwischen 32 % bei den U-2/OS β 1 AS-Zellen und 12 % bei den U-2/OS β 3 AS Zellen; dieses Knockout-Maximum konnte jeweils nach 24 Stunden gemessen werden. Ein weiterer Aspekt der Suppression zeigte sich sowohl bei den U-2/OS β 1 Antisense-Zellen als auch bei den MG-63 β 2 AS Zellen: nach 48 Stunden konnte eine Zunahme des supprimierten Isoenzym beobachtet werden. Möglicherweise liegt hier ein kompensatorisches Rebound Phänomen mit überschießender Expression des Enzyms vor. Das Antisense induzierende Hormon Ponasterone A hat zu diesem Zeitpunkt bereits seine Wirkung verloren. Es ist im Zellkulturmedium nur 36 Stunden aktiv (Auskunft der Firma Invitrogen).

Bei den mechanosensiblen MG-63 Zellen konnte eine stabile Antwort der Zellen auf die Suppression in MG-63 β 1 AS mit 29 % und in MG-63 β 2 AS mit 25 % Reduktion des jeweiligen Isoenzym nach 24h beobachtet werden.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Phospholipase C β 2 eine entscheidende Rolle bei der Mechanotransduktion spielt. Um diese Ergebnisse weiter zu sichern müssen sich jedoch noch eine Reihe weiterer Experimente an diese Untersuchung anschließen.

4.4 Alternative Methoden zur Enzymsuppression

Die präzise Kontrolle der Genexpression ist ein unschätzbares Werkzeug bei der Untersuchung physiologischer Prozesse. Anwendungen für die regulierbare Genexpression beinhalten die steuerbare Überexpression von toxischen oder teratogenen Genen, die Gentherapie sowie die Antisense RNA Expression (Jaenisch 1988).

Zur Suppression der Enzymaktivität werden zur Zeit viele verschiedene molekularbiologische Methoden verwendet. So konnten verschiedene Isoenzyme der Phospholipase C mittels in die Zelle injizierter Antikörper supprimiert werden. Mittels Mikroinjektion von Antikörpern gegen die Phospholipase C γ konnte so das Zellwachstum gestoppt werden (Smith et al 1990).

Für Zellkulturen wurden außerdem durch Steroide induzierbare Systeme beschrieben, mit denen die zelluläre Genexpression gezielt gesteuert werden kann. Als Nachteile dieser Methode erwies sich die Vielzahl der Steroideffekte auf den Zellstoffwechsel. Des Weiteren wurden Tetrazyklin-regulierte Systeme etabliert, bei welchen die Expression des gewünschten Gens in Abwesenheit des Antibiotikums Tetrazyklin gesteigert wird (Gossen & Bujard 1992; Furth et al. 1994). Dieses System wurde auch in transgenen Mäusen benutzt (Furth et al. 1994; Shockett et al. 1995). Es besitzt jedoch auch Nachteile. Unter Anderem sind hier die dauernde Behandlung mit Tetrazyklin und die lange Halbwertszeit des Antibiotikums zu nennen.

In den letzten Jahren wurde eine entscheidende neue Methode zur Untersuchung von Genprodukten entwickelt. Sie wird als „Gene silencing“ bezeichnet. Dieser Prozess wurde in eukaryonten Zellen entdeckt. Er kann unter Anderem als Abwehrmechanismus dienen, spielt aber auch bei der physiologischen Regulation von Genen eine entscheidende Rolle. Nach Infektion einer Zelle mit einem Virus wird viruseigene dsRNA in großen Mengen produziert. Das zelleigene „Immunsystem“ erkennt die fremde RNA und aktiviert nach der Translation Abwehrprozesse, die das fremde Genom zum Schweigen bringen (Hammond et al. 2001). Dieser Mechanismus wird als RNA interference oder RNAi bezeichnet (Fire et al. 1998). Während des RNAi Prozesses werden längere dsRNA

Fragmente in kleinere Fragmente zerlegt, diese werden als siRNA (small interfering RNA) bezeichnet. Diese siRNAs führen dann innerhalb eines Endonukleasenkomplexes zur Degradation von zu ihr homologer mRNA. Das Genprodukt der mRNA kann als Folge nicht mehr produziert werden (Elbashir et al. 2001). SiRNAs sind aktuell wahrscheinlich die beste Methode zur gezielten Ausschaltung von Enzymen. Sie besitzen eine ausgezeichnete Spezifität bezüglich der Ziel-mRNA, eine hohe Effizienz bei der Genausschaltung sowie eine lange Wirkung bezüglich der Gensuppression. So führt die Transfektion von siRNA in tierischen Zellen zu einer effizienten, lange anhaltenden posttranskriptionellem Suppression für das spezifische Enzym (Caplen et al. 2001). Hier liegt für weitere Untersuchungen mittels Enzymsuppression ein sehr wertvolles molekularbiologisches Werkzeug vor.

5 Zusammenfassung

Knochen reagiert adaptiv auf mechanische Belastung. Dies kann sowohl in vivo als auch in vitro gezeigt werden. Bei Belastung kommt es zur Neubildung von Knochenmatrix durch Osteoblasten. Bei Entlastung steht der Abbau der Grundsubstanz durch Osteoklasten im Vordergrund. Osteoblasten scheinen auf zellulärer Ebene in der Lage zu sein diese mechanische Belastung zu detektieren. Auf eine verstärkte Belastung reagieren sie mit einer erhöhten Produktion von Matrixproteinen sowie mit einer verstärkten Zellteilung.

Neben primären Osteoblastenkulturen zeigen auch Kulturen von Osteosarkomzellen eine Erhöhung der Proliferationsrate nach mechanischer Belastung. Sowohl diese Eigenschaft als auch ein ähnlicher Phänotyp und gleiche Expressionsmuster verschiedener für Osteoblasten typischer Enzyme machen Osteosarkomzellen zu einem möglichen Modell für Versuche zur Mechanotransduktion. Da die Kultivierung der Osteosarkomzellen deutliche Vorteile gegenüber der von Primärkulturen besitzt, wurden diese für die Zellkulturexperimente benutzt.

Bei Versuchen mit der Vier-Punkt-Dehnungsmaschine zeigte die Osteosarkomzelllinie MG-63 eine Steigerung der Proliferationsrate von 22%, ähnlich der Steigerung der Proliferationsrate primärer Osteoblasten. In der Osteosarkomzelllinie U-2/OS konnte keine Steigerung der Proliferationsrate beobachtet werden. Ziel dieser Arbeit war die Identifikation des Isoenzyms der Phospholipase C, welches an der frühen Antwort der Osteosarkomzellen auf mechanische Stimuli beteiligt ist. In diesem Rahmen wurden mehrere Osteosarkomzelllinien etabliert, in denen verschiedene Isoenzyme der phosphoinositol-spezifischen Phospholipase C mittels eines induzierbaren Antisense-Systems gezielt supprimiert werden konnten. Dies gelang für die zuvor auf ihre Mechanosensibilität untersuchten Osteosarkomzelllinien MG-63 (PLC β 1, β 2) und U-2/OS (β 1, β 2 und β 3). Das Expressionsverhalten der verschiedenen Isoenzyme nach Antisense mRNA-Induktion wurde im Weiteren beobachtet. Hierbei wurde durch Dosis-Wirkungskurven zunächst die optimale Dosierung des

Knockout-induzierenden Hormones Ponasterone A ermittelt. Diese Ergebnisse wurden dann zur Erstellung einer zeitabhängigen Darstellung des zu supprimierenden Enzymes verwendet. Der Grad der Enzymsuppression bewegte sich je nach Osteosarkomzelle und Hormonkonzentration zwischen 10% und 45%.

Die so etablierten, mechanosensiblen MG-63 Zellen mit supprimierbaren Isoformen der Phospholipase C wurden dann einer mechanischen Belastung mit definierter Größe von $4000\mu\epsilon$ bei 30 täglichen Zyklen mit einer Frequenz von 1Hz ausgesetzt. Hier zeigten sich unterschiedliche Antworten auf mechanische Belastung. MG-63 Osteosarkomzellen, in denen das Isoenzym PLC $\beta 1$ supprimiert wurde, zeigten als Antwort auf diese Belastung eine deutliche Erhöhung ihrer Proliferationsrate. MG-63 Osteosarkomzellen, in denen die Phospholipase C $\beta 2$ supprimiert wurde, zeigten keine Steigerung der Proliferationsrate nach Dehnung im Gegensatz zu den MG-63 Zellen des Wildtyps. Betrachtet man hierzu noch die fehlende Mechanosensibilität in U-2/OS Zellen (ihnen fehlt die PLC $\beta 2$), deuten die Ergebnisse darauf hin, dass das Isoenzym Phospholipase C $\beta 2$ eine Rolle beim Prozess der Mechanotransduktion spielt.

6 Literatur

Aarden, E. M., Burger, E. H., and Nijweide, P. J. (1994). Function of osteocytes in bone. *J. Cell Biochem.* **55**, 287-299.

Aarden, E. M., Nijweide, P. J., Van der Plas, A., Alblas, M. J., Mackie, E. J., Horton, M. A., and Helfrich, M. H. (1996). Adhesive properties of isolated chick osteocytes in-vitro. *Bone* **18**, 305-313.

Bahk, Y. Y., Lee, Y. H., Lee, T. G., Seo, J. K., Ryu, S. H., and Suh, P. G. (1994). Two forms of phospholipase C-beta 1 generated by alternative splicing. *J. Biol. Chem.* **269**, 8240-8245.

Basset, C. A. L., and Becker, R. O. (1962). Generation of electric potentials by bone in response to mechanical stress. *Science* **137**, 1063-1064.

Baylink, D. J., Finkelmann, R. D., and Mohan, S. (1993). Growth factors to stimulate bone formation. *J. Bone Miner. Res.* **8 Suppl 2**, S565-S572.

Berridge, M. J. (1984). Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. J.* **220**, 345-360.

Berridge, M. J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**, 315-325.

Biliau, A., Edy, V. G., Heremans, H., Van Damme, J., Desmyter, J., Georgiades, J. A., and De Somer, P. (1977). Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63. *Antimicrob. Agents Chemother.* **12**, 11-15.

Birnboim, H. C., and Doley, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513-1523.

Bloomquist, B. T., Shortridge, R. D., Schneuwly, S., Perdew, M., Montell, C., Steller, H., Rubin, G., and Pak, W. L. (1988). Isolation of a putative phospholipase C gene of *Drosophila*, *norpA*, and its role in phototransduction. *Cell* **54**, 723-733.

Bodine, P. V., and Komm, B. S. (1999). Evidence that conditionally immortalized human osteoblasts express an osteocalcin receptor. *Bone* **25**, 535-543.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Brighton, C. T., Stafford, B., Gross, S. B., Leatherwood, D. F., Williams, J. L., and Pollack, S. R. (1991). The proliferative and synthetic response of isolated calvarial bone cells of rats to cyclic biaxial mechanical strain. *J. Bone Joint Surg.* **73A**, 320-331.

Brophy, C. M., Mills, I., Rosales, O., Isales, C., and Sumpio, B. E. (1993). Phospholipase C: a putative mechanotransducer for endothelial cell response to acute haemodynamic changes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**, 576-581.

Bruzik, K. S., Morocho, A. M., Jhon, D. Y., Rhee, S. G., and Tsai, M. D. (1992). Phospholipids chiral at phosphorous. Stereochemical mechanism for the formation of inositol 1-phosphate catalyzed by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochemistry* **31**, 5183-5193.

Buckley, M. J., Banes, A. J., Levin, L. G., Sumpio, B. E., Sato, M., Jordan, R., Gilbert, J., Link, G. W., and Tran Son Tay, R. (1988). Osteoblasts increase their rate of division and align in response to cyclic, mechanical tension, in vitro. *Bone Miner.* **4**, 225-236.

Buckwalter, J. A., Glimcher, M. J., Cooper, R. R., and Recker, R. (1995a). Bone biology. Part I. structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *J. Bone Joint Surg.* **77-A**, 1256-1275.

Buckwalter, J. A., Glimcher, M. J., Cooper, R. R., and Recker, R. (1995b). Bone biology. Part II. Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. *J. Bone Joint Surg.* **77-A**, 1276-1289.

Burger, E. H., and Veldhuijzen, J.P. (1993). Influence of mechanical factors on bone formation, resorption, and growth in vitro. In 'Bone – Bone Growth' (K. Hall, ed.). CRC Press, Melbourne, **7**, 37-56.

Burr, D. B., Milgrom, C., Fyhrie, D., Forwood, M., Nyska, M., Firestone, A., Hoshaw, S., Saiag, E., and Simkin, A. (1996). In vivo measurement of human tibial strains during vigorous activity. *Bone* **18**, 405-410.

Canalis, E., and Raisz, L. (1980). Effect of fibroblast growth factors on cultured fetal rat calvaria. *Metabolism* **29**, 108.

Cann, C. E., and Adachi, R. R. (1983). Bone resorption and mineral excretion in rats during spaceflight. *Am. J. Physiol.* **244**, R327-R331.

Caplen, N.J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A., and Morgan, R. A. (2001). Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 9742-9747.

Centrella, M., Horowitz, M. C., Wozney, J. M., and McCarthy, T. L. (1994). Transforming growth factor-beta gene family members and bone. *Endocr. Rev.* **15**, 27-39.

Chen, N. X., Ryder, K. D., Pavalko, F. M., Turner, C. H., Burr, D. B., Qiu, J., and Duncan, R. L. (2000). Ca^{2+} regulates fluid shear-induced cytoskeletal reorganization and gene expression in osteoblasts. *Am. J. Physiol.* **278**, C989-C997.

Chung, C. T., Niemala, S. L., and Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2172-2175.

Clapham, D. E., and Neer, E. J. (1997). G protein beta gamma subunits. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**, 167-203.

Cocco, L., Capitani, S., Barnabei, O., Gilmour, R. S., Rhee, S. G., and Manzoli, F. A. (1999). Inositides in the nucleus: further developments on phospholipase C beta 1 signalling during erythroid differentiation and IGF-I induced mitogenesis. *Adv. Enzyme Regul.* **39**, 287-297.

Dassouli, A., Sulpice, J. C., Roux, S., and Crozatier, B. (1993). Stretch-induced inositol trisphosphate and tetrakisphosphate production in rat cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **25**, 973-982.

Davidson, R. M., Tatkis, D. W., and Auerbach, A. L. (1990). Multiple forms of mechanosensitive ion channels in osteoblast-like cells. *Pflugers Arch.* **416**, 646-651.

Dedhar, S., Argraves, W. S., Suzuki, S., Ruoslahti, E., and Pierschbacher, M. D. (1987). Human osteosarcoma cells resistant to detachment by an arg-gly-asp containing peptide overproduce the fibronectin receptor. *J. Cell Biol.* **105**, 1175-1182.

Dempster, D. W., Cosman, F., Parisien, M., Shen, V., and Lindsay, R. (1993). Anabolic actions of parathyroid hormone on bone [published erratum appears in *Endocr. Rev.* 1994 Apr; 15(2):261]. *Endocr. Rev.* **14**, 690-709.

Dibbets, J. M .H. (1992). One century of Wolff's law. In 'Current concepts in bone growth and remodeling dynamics'. (Ed. E.D. Carlson.) pp. 1-13. (University of Michigan, Center for Human Groth and Development: Ann Harbor.)

Duncan, R. L., and Misler, S. (1989). Voltage-activated and stretch-activated Ba²⁺ conducting channels in an osteoblast-like cell line (UMR-106). *FEBS Lett.* **251**, 17-21.

Duncan, R. L., and Turner, C. H. (1995). Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif. Tissue Int.* **57**, 344-358.

Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* **20**, 6877-6888.

El Haj, A. J., and Thomas, G. P. (1994). Cellular modeling of mechanical interactions with the skeleton. Lyall, F. and El Haj, A. J. pp 147-163. 1994. Cambridge, Cambridge University Press. Biomechanics and Cells.

Ellis, M. V., Carne, A., and Katan, M. (1993). Structural requirements of phosphatidylinositol-specific phospholipase C delta1 for enzyme activity. *Eur. J. Biochem.* **213**, 339-347.

Emori, Y., Homma, Y., Sorimachi, H., Kawasaki, H., Nakanishi, O., Suzuki, K., and Takenawa, T. (1989). A second type of rat phosphoinositide-specific phospholipase C containing a src-related sequence not essential for phosphoinositide-hydrolyzing activity. *J. Biol. Chem.* **264**, 21885-21890.

Enomoto, H., Yamashita, S., and Usa, T. (1993). Autocrine / paracrine function of parathyroid hormone-related peptide in rat osteoblast-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **191**, 1261-1269.

Essen, L. O., Perisic, O., Cheung, R., Katan, M., and Williams, R. L. (1996). Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C delta. *Nature* **380**, 595-602.

Essen, L. O., Perisic, O., Lynch, D. E., Katan, M., and Williams, R. L. (1997). A ternary metal binding site in the C2 domain of phosphoinositide-specific phospholipase C-delta1. *Biochemistry* **36**, 2753-3762.

Evans, D. M., and Ralston, S. H. (1996). Nitric oxide and bone. *J. Bone Miner. Res.* **11**, 300-305.

Evans, L., Frenkel, L., Brophy, C. M., Rosales, O., Sai Sudhaker, C. B., Li, G., Du, W., and Sumpio, B. E. (1997). Activation of diacylglycerol in cultured endothelial cells exposed to cyclic strain. *Am. J. Physiol.* **272**, C650-C656.

Exton, J. H. (1996). Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **36**, 481-509.

Exton, J. H. (1997). Cell signalling through guanine-nucleotide-binding regulatory proteins (G proteins) and phospholipases. *Eur. J. Biochem.* **243**, 10-20.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. **391**, 806-811.

Fournier, B., and Price, P. (1991). Characterization of a new human osteosarcoma cell line OHS-4. *J. Cell. Biol.* **114**, 577-583.

Freshney, R. I. (1987). 'Culture of animal cells. A manual of basic technique.' Ed. 2., Alan R. Liss, Inc., New York.

Frost, H. M. (1964). Bone Biodynamics. Boston, MA: Little and Brown.

Frost, H. M. (1983). A determinant of bone architecture. The minimum effective strain. *Clinic. Orthop.* **200**, 344-358.

Frost, H. M. (1987). The mechanostat: A proposed pathogenic mechanism of osteoporosis and the bone mass effects of mechanical and nonmechanical agents. *Bone* **2**, 73-85.

Frost, H. M. (1988). Vital biomechanics: proposed general concepts for skeletal adaptations to mechanical usage. *Calcif. Tissue Int.* **42**, 145-156.

Furlanut, M., Fiandini, G., Melacini, P., Padrini, R., and Ferrari, M. (1977). Effects of phospholipase C on the electrical and mechanical activity of guinea pig taenia coli. *Pharmacol. Res. Commun.* **9**, 251-258.

Furth, P. A., St. Onge, L., Boger, H., Gruss, P., Gossen, M., Kistner, A., Bujard, H., Henninghausen, L. (1994). Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9302-9306.

Garcia, P., Gupta, R., Shah, S., Morris, A. J., Rudge, S. A., Scarlata, S., Petrova, V., McLaughlin, S., and Rebecchi, M. J. (1995). The pleckstrin homology domain of phospholipase C-delta1 binds with high affinity to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in bilayer membranes. *Biochemistry* **34**, 16228-16234.

Gerfen, C. R., Choi, W. C., Suh, P. G., and Rhee, S. G. (1988). Phospholipase C I and II brain isozymes: immunohistochemical localization in neuronal systems in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 3208-3212.

Glücksman, A. (1942). The role of mechanical stresses in bone formation in vitro. *J. Anat.* **76**, 231-239.

Gossen, M. and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5547-5551.

Guharay, F., and Sachs, F. (1984). Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle. *J. Physiol. Lond.* **352**, 685-701.

Hai, C. M., (2000). Mechanosensitive modulation of receptor-mediated crossbridge activation and cytoskeletal organization in airway smooth muscle. [In Process Citation]. *Arch. Pharm. Res.* **23**, 535-547.

Haley, J. E., Abogadie, F. C., Fernandez-Fernandez, J. M., Dayrell, M., Vallis, Y., Buckley, N. J., and Brown, D. A. (2000). Bradykinin, but not muscarinic, inhibition of M-current in rat sympathetic ganglion neurons involves phospholipase C-beta4. *J. Neurosci.* **20**, RC 105 (1-5).

Hammond, S. M., Caudy, A. A., and Hannon, G. J. (2001). Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 110-119.

Hara, A., Ikeda, T., Nomura, S., Yagita, H., Okumura, K., and Yamauchi, Y. (1996). In vivo implantation of human osteosarcoma cells in nude mice induces bones with human-derived osteoblasts and mouse-derived osteocytes. *Lab. Invest.* **75**, 707-717.

Harell, A., Dekel, S., and Binderman, I. (1977). Biochemical effect of mechanical stress on cultured bone cells. *Calcif. Tissue Res.* **22 Suppl**, 202-207.

Harris, A. K., Wild, P., and Stopak, D. (1980). Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science* **208**, 177-179.

- Harrison, R. G. (1907). Observations on the living developing nerve fiber. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **4**, 140-143.
- Harter, L. V., Hruska, K. A., and Duncan, R. L. (1995). Human osteoblast-like cells respond to mechanical strain with increased bone matrix protein production independent of hormonal regulation. *Endocrinology* **136**, 528-535.
- Hasegawa, S., Sato, S., Saito, S., Suzuki, Y., and Brunette, D. M. (1985). Mechanical stretching increases the number of cultured bone cells synthesizing DNA and alters their pattern of protein synthesis. *Calcif. Tissue Int.* **37**, 431-436.
- Haslam, R. J., Koide, H. B., and Hemmings, B. A. (1993). Pleckstrin domain homology. *Nature* **363**, 309-310.
- Hepler, J. R., Kozasa, T., Smrcka, A. V., Simon, M. I., Rhee, S. G., Sternweis, P. C., and Gilman, A. G. (1993). Purification from Sf9 cells and characterization of recombinant G_q alpha and G₁₁ alpha. Activation of purified phospholipase C isozymes by G alpha subunits. *J. Biol. Chem.* **268**, 14367-14375.
- Hert, J., Liskova, M., and Lauda, J. (1971). Regulation of bone to mechanical stimuli, Part I. *Folia Morph.* **19**, 300.
- Hokin, M. R., and Hokin, L. E. (1989). The Journal of Biological Chemistry, Volume 203, 1953: Enzyme secretion and the incorporation of P32 into phospholipides of pancreas slices [classical article]. *Nutr. Rev.* **47**, 170-172.
- Homma, Y., Takenawa, T., Emori, Y., Sorimachi, H., and Suzuki, K. (1989). Tissue- and cell type-specific expression of mRNAs for four types of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**, 406-412.
- Hondal, R. J., Zhao, Z., Kravchuk, A. V., Liao, H., Riddle, S. R., Yue, X., Bruzik, K. S., and Tsai, M. D. (1998). Mechanism of phosphatidylinositol-specific

phospholipase C: a unified view of the mechanism of catalysis. *Biochemistry* **37**, 4568-4580.

Ingber, D. E. (1993). Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *J. Cell. Sci.* **104**, 613-627.

Ingber, D. E., Dike, L., Hansen, L., Karp, S., Liley, H., Maniotis, A., McNamee, H., Mooney, D., Plopper, G., and Sim, J. (1994). Cellular tensegrity: exploring how mechanical changes in the cytoskeleton regulate cell growth, migration, and tissue pattern during morphogenesis. *Int. Rev. Cytol.* **150**, 173-224.

Izant, J. G., and Weintraub, H. (1984). Inhibition of thymidine kinase gene expression by antisense RNA: a molecular approach to genetic analysis. *Cell* **36**, 1007-1015.

Jaenisch, K. (1988). Transgenic animals. *Science* **240**, 1468-1474.

Jee, W. S., Lin, B. Y., Ma, Y. F., and Ke, H. Z. (1995). Extra cancellous bone induced by combined prostaglandin E₂ and risedronate administration is maintained after their withdrawal in older female rats. *J. Bone Miner. Res.* **10**, 963-970.

Jhon, D. Y., Lee, H. H., Park, D., Lee, C. W., Lee, K. H., Yoo, O. J., and Rhee, S. G. (1993). Cloning, sequencing, purification, and G_q-dependent activation of phospholipase C-beta 3. *J. Biol. Chem.* **268**, 6654-6661.

Ji, Q. S., Winnier, G. E., Niswender, K. D., Horstman, D., Wisdom, R., Magnuson, M. A., and Carpenter, G. (1997). Essential role of the tyrosine kinase substrate phospholipase C-gamma1 in mammalian growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2999-3003.

Jiang, H., Wu, D., and Simon, M. I. (1994). Activation of phospholipase C beta 4 by heterotrimeric GTP-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **269**, 7593-7596.

Johnson, D. L., Mcallister, T. N., and Frangos, J. A. (1996). Fluid-flow stimulates rapid and continuous release of nitric-oxide in osteoblasts. *Am. J. Phys. Endocrin. Metab.* **34**, E.

Jones, D. B., and Bingmann, D. (1991). How do osteoblasts respond to mechanical stimulation. *Cells and Materials* **1**, 329-340.

Jones, D. B., Leivseth, G., Sawada, Y., van der Sloten, J., and Bingmann, D. (1993). Application of homogenous, defined strains to cell cultures. In 'Society for Experimental Biology'. (Ed. By F. Lyall and A. J. El Haj). pp. 197-219. (Cambridge University Press: Cambridge.)

Jones, D. B., Leivseth, G., and Tenbosch, J. (1995). Mechano-reception in osteoblast-like cells. *Biochim. Biol. Cell.* **73**, 525-534.

Jones, D. B., Nolte, H., Scholuebbbers, J. G., Turner, E., and Veltel, D. (1991). Biochemical signal transduction of mechanical strain in osteoblast-like cells. *Biomaterials* **12**, 101-110.

Jones, D. B., Scholuebbbers, J. G., Becker, M., and Doty, S. (1988). Evidence for more than one type of bone forming cell. In 'Fortschritte der Osteologie in Diagnostik und Therapie'. (F. H. W. Heuck and E. Keck, ed.) pp. 313-326. Springer-Verlag Berlin: Heidelberg.)

Kim, C. G., Park, D., and Rhee, S. G. (1996). The role of carboxyl-terminal basic amino acids in G_q-dependent activation, particulate association, and nuclear localization of phospholipase C-beta1. *J. Biol. Chem.* **271**, 21187-21192.

Kim, D., Jun, K. S., Lee, S. B., Kang, N. G., Min, D. S., Kim, Y. H., Ryu, S. H., Suh, P. G., and Shin, H. S. (1997). Phospholipase C isozymes selectively couple to specific neurotransmitter receptors. *Nature* **389**, 290-293.

Kim, S., McKay, R. R., Miller, K., and Shortridge, R. D. (1995). Multiple subtypes of phospholipase C are encoded by the *norpA* gene of *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* **270**, 14376-14382.

Kim, Y. K., Dirksen, E. R., and Sanderson, M. J. (1993). Stretch-activated channels in airway epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **265**, C1306-C1318.

Klein-Nulend, J., Semeins, C. M., Ajubi, N. E., Nijweide, P. J., and Burger, E. H. (1995a). Pulsating fluid flow increases nitric oxide (NO) synthesis by osteocytes but not fibroblasts-correlation with prostaglandin upregulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **217**, 640-648.

Klein-Nulend, J., Van der Plas, A., Semeins, . M., Ajubi, N. E., Frangos, J. A., Nijweide, P. J., and Burger, E. H. (1995b). Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro. *FASEB J.* **9**, 441-445.

Kobayashi, M., Nakanishi, K., and Koreeda, M. (1967). The moulting hormone activity of ponasterones on *Musca domestica* (Diptera) and *Bombyx mori* (Lepidoptera). *Steroids* **9**, 529-536.

Lane Smith, R., Trindade, M. C., Ikenoue, T., Mohtai, M., Das, P., Carter, D. R., Goodman, S. B., and Schurmann, D. J. (2000). Effects of shear stress on articular chondrocyte metabolism. *Biorheology* **37**, 95-107.

Lanyon, L. E. (1984). Functional strain as a determinant for bone remodeling. *Calcif. Tissue Int.* **36 Suppl. 1**, 56-61.

Lanyon, L. E., Hampson, W. G., Goodship, A. E., and Shah, J. S. (1975). Bone deformation recorded in vivo from strain gauges attached to the human tibial shaft. *Acta Orthop. Scand.* **46**, 256-268.

Lanyon, L. E., and Smith, R. N. (1970). Bone strain in tibia during normal quadrupedal locomotion. *Acta Orthop. Scand.* **41**, 238-248.

Lee, C. W., Lee, K. H., Lee, S. B., Park, D., and Rhee, S. G. (1994). Regulation of phospholipase C-beta 4 by ribonucleotides and the alpha subunit of G_q. *J. Biol. Chem.* **269**, 25335-25338.

LeMellay, V., Grosse, B., and Lieberherr, M. (1997). Phospholipase C beta and membrane action of calcitriol and estradiol. *J. Biol. Chem.* **272**, 11902-11907.

Lemmon, M. A., Falasca, M., Ferguson, K. M., and Schlessinger, J. (1997). Regulatory recruitment of signalling molecules to the cell membrane by pleckstrin-homology domains. *Trends Cell Biol.* **7**, 237-242.

Lin, G. L., Bennett, C. F., and Tsai, M. D. (1990). Phospholipids chiral at phosphorous. Stereochemical mechanism of reactions catalyzed by phosphatidylinositide-specific phospholipase C from *Bacillus cereus* and guinea pig uterus. *Biochemistry* **29**, 2747-2757.

Lindl, T., and Bauer, J. (1994). Zell- und Gewebekultur. (Gustav Fischer Verlag: Stuttgart-Jena-New York.)

Lopez, I., Mak, E. C., Ding, J., Hamm, H. E., and Lomasney, J. W. (2001). A novel bifunctional phospholipase C that is regulated by G-alpha 12 and stimulates the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **4**, 2758-2765.

Majeska, R. J., Rodan, S. B., and Rodan, G. A. (1981). Parathyroid hormone-responsive clonal cell lines from rat osteosarcoma. *Endocrinology* **107**, 1494-1503.

Mann, H. B., and Whitney, D. R. (1947). On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann. Math. Statist.* **18**, 50-60.

Manzoli, L., Billi, A. M., Faenza, I., Matteucci, A., Martelli, A. M., Peruzzi, D., Falconi, M., Rhee, S. G., Gilmour, R. S., and Cocco, L. (1999). Nuclear phospholipase C: a novel aspect of phosphoinositide signalling. *Anticancer Res.* **19**, 3753-3756.

Manzoli, L., Billi, A. M., Rubbini, S., Bavelloni, A., Faenza, I., Gilmour, R. S., Rhee, S. G., and Cocco, L. (1997). Essential role for nuclear phospholipase C beta(1) in insulin-like growth factor I-induced mitogenesis. *Cancer Res.* **57**, 2137-2139.

Mao, G. F., Kunapuli, S. P., and Koneti, R. A. (2000). Evidence for two alternatively spliced forms of phospholipase C-beta2 in haematopoietic cells. *Br. J. Haematol.* **110**, 402-408.

Maroy, P., Dennis, R., Beckers, C., Sage, B. A., and O'Connor, J. D. (1978). Demonstration of an ecdysteroid receptor in a cultured cell line of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 6035-6038.

Masuoka, M., Orita, S., Shino, A., Matsuzawa, T., and Nakayama, R. (1970). Pharmacological studies of insect metamorphosing hormone: ponasterone A, ecdysterone, and inkosterone, in the rat. *Jpn. J. Pharmacol.* **20**, 142-156.

Matsumoto, H., Baron, C. B., and Coburn, R. F. (1995). Smooth muscle stretch-activated phospholipase C activity. *Am. J. Physiol.* **268**, C458-C465.

Mayer, B. J., Ren, R., Clark, K. L., and Baltimore, D. (1993). A putative modular domain present in diverse signaling proteins [letter]. *Cell* **73**, 629-630.

Michell, R. H. (1975). Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim. Biophys. Acta* **415**, 81-87.

Milhaud, G., Perault, A. M., and Moukhtar, M. S. (1965). Study of the hypocalcemic mechanism of action of thyrocalcitonin. *C. R. Acad. Sci.* **261**, 813-816.

Min, D. S., Kim, D. M., Lee, Y. H., Seo, J., Suh, P. G., and Ryu, S. H. (1993a). Purification of a novel phospholipase C isozyme from bovine cerebellum. *J. Biol. Chem.* **268**, 12207-12212.

Min, D. S., Kim, Y., Lee, Y. H., Suh, P. G., and Ryu, S. H. (1993b). A G-protein-coupled 130 kDa phospholipase C isozyme, PLC-beta 4, from particulate fraction of bovine cerebellum. *FEBS Lett.* **331**, 38-42.

Mizuguchi, M., Yamada, M., Kim, S. U., and Rhee, S. G. (1991). Phospholipase C isozymes in neurons and glial cells in culture: an immunocytochemical and immunochemical study. *Brain Res.* **548**, 35-40.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* **65**, 55-63.

Murray, D. W., and Rushton, N. (1990). The effect of strain on bone cell prostaglandin E2 release: a new experimental method. *Calcif. Tissue Int.* **47**, 35-39.

Nakanishi, K., Koreeda, M., Sasaki, S., Chang, M. L., and Hsu, H. Y. (1966). Insect hormones. The structure of Ponasterone A, an insect-moulting hormone from the leaves of *Podocarpus nakaii* Hay. *Chem. Commun.* 915-917.

Nakashima, S., Banno, Y., Watanabe, T., Nakamura, Y., Mizutani, T., Sakai, H., Zhao, Y., Sugimoto, Y., and Nozawa, Y. (1995). Deletion and site-directed

mutagenesis of EF-hand domain of phospholipase C-delta 1: effects on its activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **211**, 365-369.

Nalefski, E. A., and Falke, J. J. (1996). The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci.* **5**, 2375-2390.

Nebigil, C. G. (1997). Suppression of phospholipase C beta, gamma, and delta families alters cell growth and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels. *Biochemistry* **36**, 15949-15958.

No, D., Yao, T. P., and Evans, R. M. (1996). Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3346-3351.

Parfitt, A. M. (1983). The physiologic and clinical significance of bone histomorphometric data. In 'Bone Histomorphometry'. (Ed. R. R. Recker) pp. 143-222. (CRC Press: Boca Raton, FL.)

Parfitt, A. M. (1994). Osteonal and hemi-osteonal remodeling: The spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J. Cell. Biochem.* **55**, 273-286.

Park, D., Jhon, D. Y., Kriz, R., Knopf, J., and Rhee, S. G. (1992). Cloning, sequencing, expression, and G_q-independent activation of phospholipase C-beta 2. *J. Biol. Chem.* **267**, 16048-16055.

Park, D., Jhon, D. Y., Lee, C. W., Ryu, S. H., and Rhee, S. G. (1993). Removal of the carboxy-terminal region of phospholipase C-beta1 by calpain abolishes activation by G alpha q. *J. Biol. Chem.* **268**, 3710-3714.

Patterson-Buckendahl, P. E., Grindeland, R. E., Martin, R. B., Cann, C. E., and Arnaud, S. B. (1985). Osteocalcin as an indicator of bone metabolism during spaceflight. *Physiologist* **28**, Suppl. **6**, 227-228.

- Pead, M. J., Suswillo, R. S., Skerry, T. M., Veda, S., and Lanyon, L. E. (1988). Increased ^3H -uridine levels in osteocytes following a single short period of dynamic loading in vivo. *Calcif. Tissue Int.* **43**, 92-96.
- Peake, M. A., Cooling, L. M., Magnay, J. L., Thomas, P. B., and El Haj, A. J. (2000). Selected contribution: regulatory pathways involved in mechanical induction of c-fos gene expression in bone cells. *J. Appl. Physiol.* **89**, 2498-2507.
- Peck, W. A., Birge, S. J., and Fedak, S. A. (1964). Bone cells: Biochemical and biological studies after enzymatic isolation. *Science* **146**, 1476-1477.
- Pitsillides, A. A., Rawlinson, S. C., Suswillo, R. F., Bourrin, S., Zaman, G., and Lanyon, L. E. (1995). Mechanical strain-induced NO production by bone cells: a possible role in adaptive bone (re)modeling? *FASEB J.* **9**, 1614-1622.
- Ponten, J., and Saksela, E. (1967). Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumors. *Int. J. Cancer* **2**, 434-447.
- Raab-Cullen, D. M., Thiede, M. A., Petersen, D. N., Kimmel, D. B., and Recker, R. R. (1994). Mechanical loading stimulates rapid changes in periosteal gene expression. *Calcif. Tissue Int.* **55**, 473-478.
- Rambaut, P. C., and Johnston, R. S. (1979). Prolonged weightlessness and calcium loss in man. *Acta Astronaut.* **6**, 1113-1122.
- Rebecchi, M. J., and Pentyala, S. N. (2000). Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol. Rev.* **80**, 1291-1335.
- Reich, K. M., Gay, C. V., and Frangos, J. A. (1990). Fluid shear stress as a mediator of osteoblast cyclic adenosine monophosphate production. *J. Cell. Physiol.* **143**, 100-104.

Rhee, S. G., and Choi, K. D. (1992). Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.* **267**, 12393-12396.

Rhee, S. G., Suh, P. G., Ryu, S. H., and Lee, S. Y. (1989). Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Science* **244**, 546-550.

Rhim, J. S., Putman, D. L., Arnstein, P., Huebner, R. J., and McAllister, R. M. (1977). Characterization of human stem cells transformed in vitro by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Int. J. Cancer* **19**, 505-510.

Rodan, G. A. (1991). Mechanical loading, estrogen deficiency, and the coupling of bone formation to bone resorption. *J. Bone. Min. Res.* **6**, 527-530.

Rodan, G. A. (1996). Coupling of bone resorption and formation during bone remodeling. In 'Osteoporosis'. (R. Marcus, D. Feldman, and J. Kelsey, Eds.) pp. 289-299. (Academic Press: San Diego.)

Rodan, G. A., Bourret, L. A., Harvey, A., and Mensi, T. (1975). Cyclic AMP and cyclic GMP: mediators of the mechanical effects in bone remodeling. *Science* **189**, 467-469.

Rodan, G. A., and Noda, M. (1991). Gene expression in osteoblastic cells. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **1**, 85-98.

Rodan, S. B., Imai, Y., Thiede, M. A., Wesolowski, G., Thompson, D., Bar-Shavit, Z., Shull, S., Mann, K., and Rodan, G. A. (1987). Characterization of a human osteosarcoma cell line (SaOS-2) with osteoblastic properties. *Cancer Res.* **47**, 4961-4966.

Roux, W. (1881). Der Kampf der Theile im Organismus. *Engelmann, Leipzig*.

Rubin, C. T., and Lanyon, L. E. (1984). Regulation of bone formation by applied dynamic loads. *J. Bone Joint Surg.* **66A**, 397-410.

Rubin, C. T., and Lanyon, L. E. (1985). Regulation of bone mass by mechanical strain magnitude. The effect of peak strain magnitude. *Calcif. Tissue Int.* **37**, 411-417.

Ruwhof, C., van Wamel, J. E., Noordzij, L. A., Aydin, S., Harper, J. C. and van der Laarse, A. (2001). Mechanical stress stimulates phospholipase C activity and intracellular calcium ion levels in neonatal rat cardiomyocytes. *Cell Calcium* **29**, 73-83.

Sage, B. A., Tanis, M. A., and O'Connor, J. D. (1982). Characterization of ecdysteroid receptors in cytosol and naive nuclear preparations of *Drosophila* Kc cells. *J. Biol. Chem.* **257**, 6373-6379.

Schmidt, C., Pommerenke, H., Durr, F., Nebe, B., and Rychly, J. (1998). Mechanical stressing of integrin receptors induces enhanced tyrosine phosphorylation of cytoskeletally anchored proteins. *J. Biol. Chem.* **273**, 5081-5085.

Schnabel, P., Mies, F., Nohr, T., Geisler, M., and Bohm, M. (2000). Differential regulation of phospholipase C-beta isozymes in cardiomyocyte hypertrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**, 1-6.

Shinar, D., and Rodan, G. A. (1993). Relationships and interactions between bone and bone marrow. In "The Hematopoietic Microenvironment: The Functional and Structural Basis of Blood Cell Development" (M. W. Long and M. S. Wicha, eds.) pp. 79-109. The Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore.

Shockett, P. E., Difilippantonio, M. Hellman, N., Schatz, D. G. (1995). A modified tetracycline-regulated system provides autoregulatory inducible gene expression in cultured cells and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6522- 6526.

Sessions, N. D., Halloran, B. P., Bikle, D. D., Wronski, D. J., Cone, C. M., and Morey-Holton, E. R. (1989). Bone response to normal weight bearing after a period of skeletal unloading. *Am. J. Physiol.* **257**, E606-E610.

Simkin, A., Ayalon, J., and Leichter, I. (1987). Increased trabecular bone density due to bone-loading exercises in postmenopausal osteoporotic women. *Calcif. Tissue. Int.* **40**, 59-63.

Skerry, T. M., Bitensyky, L., Chayen, J., and Lanyon, L. E. (1989). Early strain-related changes in enzyme activity in osteocytes following bone loading in vivo. *J. Bone Miner. Res.* **4**, 783-788.

Slater, T. F., Sawyer, B., and Straus, D. R. (1963). Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biophysical Acta* **77**, 383-393.

Smith, E. L., and Raab, D. M. (1986). Osteoporosis and physical activity. *Acta Med. Scand. Suppl.* **711**, 149-156.

Smith, M. R., Liu, Y. L., Kim, H., Rhee, S. G., and Kung, H. F. (1990). Inhibition of serum- and ras-stimulated DNA synthesis by antibodies to phospholipase C. *Science* **247**, 1075-1077.

Somjen, D., Bindermann, I., Burger, E. H., and Harell, A. (1980). Bone remodeling induced by physical stress is prostaglandin E2 mediated. *Biochim. Piophys. Acta* **627**, 91-100.

Southern E. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gelelectrophoresis. *J. Mol. Biol.* **989**, 503-517.

Streb, H., Irvine, R. F., Berridge, M. J., and Schulz, I. (1983). Release of Ca^{2+} from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* **306**, 67-69.

Talmage, R. V., and Meyer, R. A. (1967). Physiological role of parathyroid hormone. *Am. Physiol. Soc.* 343-351.

Tang, M. X., Redemann, C. T., and Szoka, F. C. Jr. (1996). In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjug. Chem.* **7**, 703-714.

Tsuchiya, H., Morishita, H., Tomita, K., Ueda, Y., and Tanaka, M. (1993). Differentiating and antitumor activities of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in vitro and 1 α -hydroxyvitamin D₃ in vivo on human osteosarcoma. *J. Orthop. Res.* **11**, 122-130.

Turner, C. H., and Pavalko, F. M. (1998). Mechanotransduction and functional response of the skeleton to physical stress: the mechanisms and mechanics of bone adaption. *J. Orthop. Sci.* **3**, 346-355.

Uthoff, H. K., and Jaworski, Z. F. G. (1978). Bone loss in response to long term immobilization. *J. Bone Joint Surg. Br.* **60B**, 420-429.

Vadiakas, G. P. and Banes, A. J. (1992). Verapamil decreases cyclic load-induced calcium incorporation in ROS 17/2.8 osteosarcoma cell cultures. *Matrix* **12**, 439-447.

Vandenburgh, H. H., Hatfaludy, S., Kalirsch, P., and Shansky, J. (1989). Skeletal muscle growth is stimulated by intermittent stretch-relaxation in tissue culture. *Am. J. Physiol.* **256**, C674-C682.

Waldo, G. L., Paterson, A., Boyer, J. L., Nicholas, R. A., and Harden, T. K. (1996). Molecular cloning, expression and regulatory activity of G alpha 11- and beta-gamma-subunit-stimulated phospholipase C-beta from avian erythrocytes. *Biochem. J.* **316**, 559-568.

Wang, N., Butler, J. P., and Ingber, D. E. (1993). Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* **260**, 1124-1127.

Wang, S., Gebre-Medhin, S., Betsholtz, C., Stalberg, P., Zhou, Y., Larsson, C., Weber, G., Feinstein, R., Oberg, K., Gobl, A., and Skogseid, B. (1998). Targeted disruption of the mouse phospholipase C beta3 gene results in early embryonic lethality. *FEBS Lett.* **441**, 261-265.

Wang, T., Pentyala, S., Elliot, J., Dowal, L., Gupta, E., Rebecchi, M. J., and Scarlata, S. (1999). Selective interaction of the C2 domains of phospholipase C-beta1 and beta2 with activated G_q. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 7843-7846.

Watson, P. A. (1991). Function follows form – generation of intracellular signals by cell-deformation. *FASEB J.* **5**, 2013-2019.

Watson, P. A., Giger, K. E., and Kempinski, A. M. (1995). Type-I and type-VIII adenylyl cyclases constitute a family whose activation is coupled to cellular-deformation through the action of calcium-calmodulin. *Biochim. Biol. Cell.* **73**, 367-372.

Wewer, U. M., Ibaraki, K., Schjorring, P., Dukin, M. E., Young, M. F., and Albrechtsen, R. (1994). A potential role for tetranectin in minealization during ostogenesis. *J. Cell Biol.* **127**, 1767-1775.

Weinbaum, S., Cowin, S. C., and Zeng, Y. (1994). A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses. *J. Biochem.* **27**, 339-360.

Weinreb, M., Rodan, G. A., and Thompson, D. D. (1991). Immobilization-related bone loss in rat is increased by calcium deficiency. *Calcif. Tissue Int.* **48**, 93-100.

Wilcoxon, F. (1945). Individual comparison by ranking methods. *Biom. Bull.* **1**, 80-83.

Williams, R. L., and Katan, M. (1996). Structural views of phosphoinositide-specific phospholipase C: signalling the way ahead. *Structure* **4**, 1387-1394.

Wolff, J. (1892). Das Gesetz der Transformation der Knochen. *Hirschwald Berlin*.

Wu, D., Jiang, H., Katz, A., and Simon, M. I. (1993a). Identification of critical regions on phospholipase C beta 1 required for activation by G-proteins. *J. Biol. Chem.* **268**, 3704-3709.

Wu, D., Katz, A., and Simon, M. I. (1993b). Activation of phospholipase C beta 2 by the alpha and beta gamma subunits of trimeric GTP-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5297-5301.

Xie, Z., and Bikle, D. D. (1999). Phospholipase C- γ 1 is required for calcium-induced keratinocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* **274**, 20421-20424.

Xie, Z., and Bikle, D. D. (2001). The role of phospholipase C- γ 1 in 1- α ,25-dihydroxyvitamin D₃ regulated keratinocyte differentiation. *Steroids* **66**, 339-345.

Yao, T. P., Forman, B. M., Jiang, Z., Cherbas, L., Chen, J. D., McKeown, M., Cherbas, P., and Evans, R. M. (1993). Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. *Nature* **366**, 476-479.

Yegutkin, G., Bodin, P., and Burnstock, G. (2000). Effect of shear stress on the release of soluble ecto-enzymes ATPase and 5'-nucleotidase along with endogenous ATP from vascular endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* **129**, 921-926.

7 Anhang

$\mu\epsilon$	Microstrain, 1Strain = Längendehnung um 100%
(v/v)	Volume over volume, Volumen-/Volumen-Verhältnis
(w/v)	Weight over volume, Gewichts-/Volumen-Verhältnis
BSA	Bovines serum albumin, Rinderserumalbumin
cAMP	Cyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Komplementäre RNA-Abschrift
cGMP	Cyklisches Guanosinmonophosphat
CIP	Calf intestine phosphatase, Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
Da	Dalton
DAG	Diazylglyzerol
EDTA	Ethylen-diamino-tetraacetic-acid, Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fetal calf serum, Fötales Kälberserum
IGF	Insulin-like growth factor, Somatomedin
IP ₃	Inositoltrisphosphat
kb	Kilobasenpaare
MAP-Kinase	Mitogen-activated protein kinase
NO	Stickoxid
PBS	Phosphate-buffered saline
PIP ₃	Phosphoinositoltrisphosphat
PLC	Phosphoinositolspezifische Phospholipase C
SDS	Sodium dodecylsulfat sulfat, Natriumdodezylsulfat
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TGF- β	Transforming growth factor β , zu den Zytokinen zählender Wachstumsfaktor
Tris	Trisaminomethan

U

Unit, Einheit

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren:

Prof. Dr. G. Aumüller

Prof. Dr. Dr. J. Daut

Prof. Dr. E. Weihe

Prof. Dr. K. Voigt

Prof. Dr. H. F. Kern

Prof. Dr. J. Seitz

Prof. Dr. Dr. H.-D. Basler

Prof. Dr. J. Niessing

Prof. Dr. H.-D. Klenk

Prof. Dr. J. Sundermeyer

Prof. Dr. H. Jungclas

Prof. Dr. M. Rothmund

Prof. Dr. R. Hofmann

Prof. Dr. R. Arnold

Prof. Dr. R. Happle

Prof. Dr. W. H. Oertel

Prof. Dr. P. Griss

Prof. Dr. L. Gotzen

Prof. Dr. Dr. H. Remschmidt

Prof. Dr. S. Schmidt

Prof. Dr. R. Moll

Prof. Dr. J.-C. Krieg

Prof. Dr. E. Baum

Prof. Dr. H. Lennartz

Prof. Dr. J. A. Werner

Prof. Dr. H. Schäfer

Prof. Dr. Czubayko

Danksagung

Für die Überlassung des Dissertationsthemas, ein stets offenes Ohr und seine Unmengen von Anregungen und Kritiken bedanke ich mich Herrn Prof. Dr. D. B. Jones. Weiter danke ich Dr. med. Maik Hoberg für die grundlegende und umfassende Ausbildung im molekularbiologischen Labor. Seine Informationen und Arbeitsanleitungen waren eine wichtige Grundlage zur Erstellung dieser Arbeit. Für ihre Unterstützung in der Zellkultur und allen organisatorischen Dingen bin ich Frau Marita Kratz und Herrn Toh-Weng Tan zu tiefem Dank verpflichtet. Dem ganzen Team der Experimentellen Orthopädie und Biomechanik Marburg gilt mein Dank für das großartige Arbeitsklima und die tolle Zeit während meiner Arbeit im Labor.

Ich bedanke mich herzlich bei meinen Eltern und Großeltern, ohne deren Unterstützung das Erstellen der Arbeit unmöglich gewesen wäre.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meiner Frau Katrin Ebert und meinem Sohn Jakob, deren Bedeutung für diese Arbeit in Worten nicht messbar ist.